



Avaliação do papel dos ácidos salicílico, abscísico e jasmónico na interacção *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix*: Implementação de um método de análise.

Marta Filipa Batista de Sá

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadora: Doutora Maria Helena Guimarães de Almeida

Co-orientadora: Doutora Maria do Rosário Beja Figueiredo Gonzaga Bronze

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria do Rosário Beja Figueiredo Gonzaga Bronze, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Doutora Maria Helena Guimarães de Almeida, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Leonor de Castro Esteves Guerra Guimarães, Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro do Instituto de Investigação Científica Tropical.

Lisboa, 2010

Agradecimentos

É com grande satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Às diversas instituições que contribuíram para a realização deste trabalho, à FCT pela atribuição da BII (IICT-DCN-CIFC-9) e financiamento dos projectos PTDC/AGR-AAM/71866/2006 e REDE/1518/REM/2005, no qual se inseriu o presente trabalho, ao ISA, ao CIFC/IICT, ao IBET e à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

À minha orientadora Professora M^a Helena Almeida, por me ter dado a conhecer o mundo da “Indústria dos Estimulantes” e ter despertado em mim a paixão pelo café. Muito obrigado pelos conhecimentos transmitidos e pela orientação deste trabalho.

À Professora M^a do Rosário Bronze por me ter facultado a possibilidade de trabalhar com o HPLC-DAD-MS/MS, sem o qual este trabalho não teria sido possível, e pela troca de impressões e sugestões.

À Doutora Leonor Guerra–Guimarães pela permanente disponibilidade, pelas críticas e sugestões, mas sobretudo pelo incansável apoio moral e boa disposição capaz de me motivar em momentos menos bons.

À Doutora M^a do Céu Silva por me ter recebido no CIFC assim como o apoio imprescindível nos estudos citológicos, e a todos os restantes colaboradores, pela forma carinhosa e bem-disposta com que me acolheram. Um agradecimento especial à Paula Leandro pela ajuda inigualável, mas sobretudo pelo carinho e palavras de encorajamento.

Ao Engenheiro Eduardo Leitão e ao Professor Luís Vilas-Boas pela disponibilidade e inestimável apoio na elaboração do trabalho prático.

Ao João Pedro Ferreira pelo incentivo e paciência para me esclarecer qualquer dúvida.

Aos meus amigos, que sempre acreditaram em mim, em especial ao André Parada, pelo apoio e a pela sua boa disposição durante o nosso estágio.

Aos meus colegas do “Banif Mais” por me apoiarem sempre que precisei.

À minha família, em especial à minha mãe pelo apoio incondicional que me deu ao longo de todo o meu percurso académico, pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviu e a sensatez com que sempre me apoiou e ajudou, e ao meu irmão por ser o meu grande orgulho.

Por fim gostaria de estender os meus agradecimentos a todos aqueles que anonimamente me foram ajudando,

Mais uma vez, a todos os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Este trabalho teve como objectivo compreender o papel dos ácidos salicílico (SA), jasmónico (JA) e abscísico (ABA) nas respostas de defesa de *Coffea arabica* induzidas durante a infecção por *Hemileia vastatrix* (ferrugem do cafeeiro). Folhas de cafeeiro S4 Agaro foram inoculadas com a raça II da ferrugem de modo a obter uma interacção incompatível. Na optimização do método para análise de SA, JA e ABA, por HPLC-MS/MS foram comparados diversos métodos baseados na extracção líquido-líquido das amostras. O método de análise por HPLC-DAD-MS/MS foi validado e procedeu-se à avaliação de SA, JA e ABA em folhas de cafeeiro inoculadas com ferrugem. Paralelamente foi realizado o estudo citológico do processo de colonização do fungo, tendo sido identificadas as diferentes fases de diferenciação pré- e pós-penetração no interior dos tecidos foliares. Na interacção incompatível foi detectado um primeiro aumento para todos os compostos entre as 20 e as 30 h.a.i, e um segundo aumento a partir das 48h.a.i., apenas para o SA e JA. Os resultados sugerem o fraco envolvimento do ABA e do JA na interacção incompatível cafeeiro-ferrugem contrariamente ao SA, confirmando o que tinha sido descrito por outros autores sobre a acção sinalizadora deste composto contra agentes patogénicos biotróficos.

Palavras-chave: ferrugem da folha do cafeeiro, citologia, HPLC-DAD-MS/MS, ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido abscísico.

Abstract

This study aimed to understand the role of salicylic (SA), jasmonic (JA) and abscisic (ABA) acids in host defense of *Coffea arabica* induced after infection with the *Hemileia vastatrix* (leaf rust). In this study leaves of S4 Agaro variety was inoculated with *H. vastatrix* race II to obtain an incompatible interaction. In the optimization of the method for analysis of SA, JA and ABA, several methods based on liquid-liquid extraction of samples were compared by HPLC-MS/MS using healthy coffee leaf samples. Quantification by HPLC-DAD-MS/MS of SA, JA and ABA in coffee leaves inoculated with rust was made after validation of the method of analysis optimized. Cytological study of infection process of the fungus, allowed identifying the different phases of differentiation of *H. vastatrix*. Results of the incompatible interaction showed that all the three compounds increased between 20 and 30h.a.i., but only SA and JA increased from 48h.a.i.. The weak increase of ABA and JA in coffee-rust incompatible interaction, on the contrary to the values obtained for SA, confirmed the assumptions of literature on the signaling action of this compound (SA) against biotrophic pathogens.

Key Words: coffee leaf rust, cytology, HPLC-DAD-MS/MS, salicylic acid, jasmonic acid, abscisic acid

Extended abstract

Coffee leaf rust, the most widespread disease of *Coffea arabica* L. cultivars, is caused by the fungus *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.. The coffee – rust interaction is a gene-for-gene system that involves at least nine dominant plant resistant genes, singly or associated. Previous cytological studies have shown that coffee resistance to *H. vastatrix* is characterized by restricted fungal growth associated with rapid localised plant cell death (hypersensitive reaction – HR). Salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) are known to be plant hormones that play a crucial role in controlling plant growth, development, and response to biotic and abiotic cues. It has been suggested that crosstalk occur among JA, SA and ABA in plant response to biological threats. The reduced concentrations of these compounds in complex samples, as it is the case of coffee leaves, requires the optimization of sample preparation techniques and the use of sensitive and selective techniques for their quantification. In order to examine the possible association of the SA, ABA and JA with the resistance response, *Coffea arabica* S4 Agaro leaves were inoculated with race II of *H. vastatrix* (incompatible interaction) and extracts were obtained at various times after inoculation. Initially, we made the optimization and validation of the method for analysis of SA, JA and ABA, by HPLC-MS/MS in leaf samples of healthy coffee. We evaluated several methods of sample preparation, all based on liquid-liquid extractions. For a better sensitivity and selectivity a MRM mode was used for the quantification, using the best transitions obtained for each compound. The optimized HPLC-MS/MS method seems adequate for the separation and quantification of SA, ABA and JA in the extracts.

Cytological study of infection process of the fungus, allowed identifying the different phases of differentiation of *H. vastatrix*, before and after penetrations in leaf tissue. In the incompatible interaction there was an initial increase of concentration for all compounds between 20h-30 hours after inoculation (h.a.i.) which leads us to consider their involvement in the hypersensitivity reaction. There was a second increase, only for SA and JA, around 48-72h.a.i., which suggests the possible involvement of these compounds in more delayed defense responses. The weak increase of ABA and JA in coffee-rust incompatible interaction, on the contrary to the values obtained for SA, confirmed the assumptions of literature on the signaling action of this compound (SA) against biotrophic pathogens.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Extended abstract	iv
Índice de figuras.....	viii
Índice de quadros	x
Abreviaturas	xi
Nota prévia	xii
I. Enquadramento Geral	1
1. O cafeeiro.....	1
1.1. Origem e distribuição geográfica do cafeeiro.....	1
1.2. Enquadramento sistemático dos cafeeiros	2
1.3. Características gerais da espécie <i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i>	3
1.4. Importância económica da cultura do cafeeiro.....	3
1.5. Da planta à chávena: uma pequena síntese.....	5
2. A ferrugem alaranjada – <i>Hemileia vastatrix</i>.....	7
2.1. Origem e distribuição geográfica	7
2.2. Importância económica	7
2.3. Taxonomia	7
2.4. Sintomatologia.....	8
2.5. Ciclo de vida.....	8
2.6. Processo de infecção	9
2.7. Meios de luta.....	10
3. Interacção cafeeiro – ferrugem alaranjada	11
3.1. Raças de <i>Hemileia vastatrix</i>	12
3.2. Grupos fisiológicos de <i>Coffea</i> spp.	12
3.3. Hereditariedade da resistência de <i>H. vastatrix</i> em <i>Coffea</i> spp.....	13
4. Considerações gerais sobre a resistência e susceptibilidade das plantas	13
4.1. Compostos sinalizadores	14
4.2. Interacção <i>C. arabica</i> – <i>H. vastatrix</i>	18
5. Análise do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abcísico	19
5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	20
5.2. Sistema HPLC-MS	22
5.3. Identificação e quantificação dos compostos.....	23

5.4. Validação do método de análise.....	23
6. Objectivos	25
II. Parte experimental	26
1. Material biológico	26
1.1. Cafeeiro.....	26
1.2. Ferrugem alaranjada	26
1.3. Inoculação.....	26
2. Preparação dos tecidos para observação ao microscópio óptico.....	27
2.1. Avaliação da germinação dos uredósporos e formação de apressórios	27
2.2. Avaliação do processo de colonização	27
3. Análise do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abcísico	27
3.1. Equipamento e reagentes	27
3.1.1. Equipamento	27
3.1.2. Reagentes	28
3.2. Preparação de soluções.....	28
3.2.1. Preparação de soluções padrão	28
3.2.2. Preparação do reagente de Carrez.....	28
3.3. Preparação das amostras a partir de tecido fresco.....	28
3.3.1. Método Ky	29
3.3.2. Método Correia.....	29
3.3.3. Método Durgbanshi	29
3.3.4. Método López-Carbonell.....	29
3.3.5. Método Wilbert	30
3.3.6. Método Verbene	30
3.4. Análise cromatográfica	31
3.4.1. Condições de análise por HPLC-DAD (1)	31
3.4.2. Condições de análise por HPLC (2).....	32
3.4.3. Condições de análise por HPLC-DAD-MS/MS.....	32
3.4.4. Optimização do método de detecção do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abcísico no HPLC-MS/MS.....	33
3.4.5. Validação do método de análise por cromatografia (HPLC-DAD-MS/MS)	33
3.5. Análise por espectrofotometria de UV	34
3.6. Tratamento dos resultados	34
III. Resultados e Discussão	35
1. Implementação do método de análise	36
1.1. Comparação de diferentes métodos de extracção por HPLC-DAD (1)	36

1.2. Optimização do método de detecção do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abscísico no HPLC-MS/MS	40
1.3. Análise de amostras resultantes de diferentes métodos de extracção por HPLC–DAD–MS/MS	43
1.4. Validação do método de análise por HPLC–DAD–MS/MS	43
1.4.1. Especificidade do método.....	44
1.4.2. Linearidade.....	44
1.4.3. Precisão	45
1.4.4. Limites analíticos	46
1.4.5. Exactidão.....	46
1.4.5.1.Otimização das condições de extracção do método Verbene <i>et al.</i> (2002).....	47
2. Estudo da interacção <i>C. arabica</i> – <i>H. vastatrix</i>.....	49
2.1. Avaliação da germinação dos uredósporos e formação de apressórios	49
2.2. Avaliação do processo de colonização	49
2.3. Análise e quantificação do ABA, SA e JA em folhas de <i>C. arabica</i> sãs e inoculadas com <i>H. vastatrix</i>	51
IV. Conclusões e perspectivas	54
V. Referências bibliográficas	56
VI. Anexos	64
Anexo I – Estudos da linearidade.....	65
Anexo II – Cartas de Controlo	70
Anexo III - Abstract e poster da Metabolomics	72

Índice de figuras

Figura 1 - Produção mundial de café desde 2004/05 a 2008/09 (fonte: ICO)	4
Figura 2 - Principais países produtores de café (2005/6 a 2008/9) (fonte: ICO)	4
Figura 4 - Representação esquemática geral da tecnologia pós-colheita do café	5
Figura 3 - Principais países consumidores de café na Europa (2005/6 a 2007/8) (fonte: FAO)	5
Figura 5 - Página inferior da folha do cafeeiro com pústulas de soros uredospóricos de cor alaranjada.....	8
Figura 6 - Ciclo de vida da <i>Hemileia vastatrix</i> (fonte: www.apsnet.org)	9
Figura 7 - Primeiras fases do processo de infecção por <i>Hemileia vastatrix</i> (esquema cedido por Silva, M.C.)	10
Figura 8 - Estrutura química do ácido salicílico (a), ácido jasmónico (b) e ácido abscísico (c)	14
Figura 9 - Esquema representativo do <i>cross-talk</i> entre o SA e o JA. As interações sinérgicas estão representadas a verde e as interações antagonistas a vermelho (fonte: Kunkel e Brooks, 2002).....	17
Figura 10 - Tipos de cromatografia líquida	20
Figura 11 - Esquema representativo dos componentes de um sistema de HPLC (fonte: www.waters.com)	21
Figura 12 - Esquema representativo do sistema triplo quadropolo (fonte: www.waters.com).....	23
Figura 13 - A: Perfil cromatográfico da solução padrão SA a 10 ppm, a: espectro de absorção correspondente	36
Figura 14 - A: Perfil cromatográfico da solução padrão ABA a 10 ppm, a: espectro de absorção correspondente	36
Figura 15 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de SA (verde), da amostra Ky controlo (rosa) e das amostras Ky controlo com sobrecarga de SA (azul) e Ky inoculado com sobrecarga de SA (azul-escuro).....	37
Figura 16 - A: Comparação dos perfis cromatográficos das soluções padrão de SA e ABA (10 ppm (azul-claro), 1 ppm (verde) e 0,5 ppm (rosa)) e da amostra Verbene (azul) para a detecção de SA; a: espectro de absorção da amostra (preto) e do SA (verde).....	38
Figura 17 - A: Comparação dos perfis cromatográficos das soluções padrão de SA e ABA (10 ppm (azul-claro), 1 ppm (verde) e 0,5 ppm (rosa)) e da amostra Verbene (azul) para a detecção de ABA; a: espectro de absorção da amostra (preto) e do SA (verde).....	38
Figura 18 - A: Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de SA a 10 ppm (verde), da amostra Durgbanshi sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Durgbanshi	

com sobrecarga de SA (azul); B: Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de ABA a 1 ppm (verde), da amostra Durgbanshi sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Durgbanshi com sobrecarga de ABA (azul).....	39
Figura 19 - A: Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de SA a 10 ppm (verde), da amostra Verbene sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Verbene com sobrecarga de SA (azul); B: Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de ABA a 1 ppm (verde), da amostra Verbene sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Verbene com sobrecarga de ABA (azul.).....	40
Figura 20- <i>Daughter Scan</i> do $[M-H]^-$ (m/z 137) do SA.....	41
Figura 21 - <i>Daughter Scan</i> do $[M-H]^-$ (m/z 263) do ABA	41
Figura 22 - <i>Daughter Scan</i> do $[M-H]^-$ (m/z 209) do JA	42
Figura 23 - Espectros de absorção de diferentes soluções de SA, para otimização do método (pág. 29, vide II.3.3.6.1.)	47
Figura 24 – Primeiras fases do processo de infecção. A – Apressório (Ap) e Hifa de penetração (Hp); B – Âncora (Anc); C – Célula mãe do haustório (CMH) (seta); D – Haustório (h) (seta) na célula subsidiária do estoma.....	50
Figura 25 - Percentagem de ABA em folhas de <i>C. arabica</i> S4 Agaro inoculadas com <i>H. vastatrix</i> raça II (interacção incompatível) relativamente a folhas sãs (controlo), no segundo e terceiro ensaio, em diferentes horas após a inoculação. “Controlo” = média dos valores de ABA nas amostras “controlo” em diferentes horas após inoculação, calculado independentemente para cada um dos ensaios, ao qual se atribuiu o valor de 100%.	51
Figura 26 - Percentagem de SA em folhas de <i>C. arabica</i> S4 Agaro inoculadas com <i>H. vastatrix</i> raça II (interacção incompatível) relativamente a folhas sãs (controlo), no segundo e terceiro ensaio, em diferentes horas após a inoculação. “Controlo” = média dos valores de SA nas amostras “controlo” em diferentes horas após inoculação, calculado independentemente para cada um dos ensaios, ao qual se atribuiu o valor de 100%.	52
Figura 27 - Percentagem de JA em folhas de <i>C. arabica</i> S4 Agaro inoculadas com <i>H. vastatrix</i> raça II (interacção incompatível) relativamente a folhas sãs (controlo), no segundo e terceiro ensaio, em diferentes horas após a inoculação. “Controlo” = média dos valores de JA nas amostras “controlo” em diferentes horas após inoculação, calculado independentemente para cada um dos ensaios, ao qual se atribuiu o valor de 100%.	53

Índice de quadros

Quadro 1 - Escala de classificação qualitativa dos tipos de reacção dos cafeeiros à <i>H. vastatrix</i> (Branquinho D'Oliveira, 1954 - 57).....	11
Quadro 2 - Programa de eluição do HPLC-DAD (1)	32
Quadro 3 - Programa de eluição do HPLC-DAD-MS/MS.....	32
Quadro 4 - Ião precursor utilizado na infusão directa no espectrómetro de massa e condições de potencial de cone e de energia de colisão	40
Quadro 5 - Transições de quantificação e de qualificação determinadas	42
Quadro 6 - Comparação dos métodos de extracção Verbene "normal", Verben "modificado", Lopez-Carbonell e Wilbert	43
Quadro 7 - Estudo da linearidade do método	44
Quadro 8 - Precisão do equipamento expressa em DPR (n=6)	45
Quadro 9 - Precisão do método (n=6)	45
Quadro 10 - Precisão intermédia (n=12).....	46
Quadro 11 - LD e LQ determinado com base nos parâmetros da recta e na razão sinal/ruído	46
Quadro 12 - Exactidão do método	46
Quadro 13 - Valores de absorvância das amostras "SA" e "SA+NaOH", após evaporação rotativa até à secura ou recuperando 1mL.....	48
Quadro 14 - Taxas de recuperação a várias etapas do processo de extracção descrito por Verbene <i>et al.</i> (2002) aplicado a soluções padrão de SA (pág. 30, vide 3.3.6.1.)	48
Quadro 15 - Taxas de recuperação em extractos de folhas com as alterações indicadas por Verbene <i>et al.</i>	48
Quadro 16 - Resumo dos resultados referentes à validação do método cromatográfico	49
Quadro 17 - Diferenciação das primeiras estruturas de infecção de <i>H. vastatrix</i> em folhas de <i>C. arabica</i> S4 Agar em diferentes tempos após a inoculação	50

Abreviaturas

ABA – Ácido abscísico

Anc – Âncora

Ap – Apressório

cdo – Comprimento de onda

CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

CMH – Célula mãe do haustório

DAD – Detector de díodos

DesvPad – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

h - Haustório

h.a.i. – Horas após a inoculação

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HR – Reacção de hipersensibilidade

Hp – Hifa de penetração

ICO – Organização Internacional do Café

JA – Ácido jasmónico

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MRM – *Multiple-Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de massa

m/z – Relação massa/carga

PAL – L-fenilalanina amoníaco-liase

POD – Peroxidase

PR – Proteínas relacionadas com a patogenicidade

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

SA – Ácido salicílico

SAR – Resistência sistémica adquirida

TCA – Ácido tricloroacético

Nota prévia

O presente trabalho foi realizado no âmbito do projecto da FCT (PTDC/AGR-AAM/71866/2006) intitulado “Abordagem interdisciplinar para a caracterização de potenciais fontes de resistência durável do cafeeiro (*Coffea* spp.) à ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*)”.

No Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) do Instituto Investigação Científica Tropical (IICT), foram realizados os estudos citológicos do processo de infecção da ferrugem alaranjada nas folhas do cafeeiro bem como a preparação dos extractos. Os ensaios para a determinação dos ácidos salicílico, jasmónico e abscísico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a Espectrometria de Massa foram efectuados no Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET) e na Faculdade de Farmácia de Universidade de Lisboa (FFUL).

I. Enquadramento Geral

1. O cafeeiro

1.1. Origem e distribuição geográfica do cafeeiro

A origem do cafeeiro está envolta em várias histórias, umas mais fantasiosas que outras, desde a descoberta das propriedades estimulantes do café atribuída ao pastor Kaldi e as suas cabras, ou camelos, consoante a versão, ou de pessoas que ficavam sem dormir quando tomavam a bebida feita a partir dos seus frutos ou sementes. No entanto, os documentos com mais rigor histórico, que relatam as peregrinações às Cidades Santas e os contactos comerciais entre a Arábia e a Abissínia, actual Etiópia, só começam a aparecer por volta dos finais do século XV (Clifford, 1985; Ferrão, 2005; Ferrão, 2009).

Para manterem o controlo da cultura do café, os árabes impuseram uma lei que bania a exportação de sementes de café férteis, sendo necessário destruir primeiro o poder germinativo (Clifford, 1985). No entanto, os holandeses conseguiram contornar essa restrição em 1616 e transportaram cafeeiros para as suas estufas (ICO, 2010).

Inicialmente apenas se consumia os frutos, em fresco ou conservados com óleo alimentar ou gordura. Também existem registos de os frutos maduros terem sido utilizados para produzir vinho (Wrigley, 1988). As autoridades do Lémen encorajavam o consumo de café como bebida, originando a abertura de diversos cafés, que depressa foram banidos por se tornarem centros de actividades políticas (ICO, 2010). Na Europa, a primeira “loja de café” abriu em Veneza em 1645, e tornou-se um local de reunião de pessoas de classes sociais superiores, como médicos, advogados e comerciantes (Wrigley, 1988; Ferrão 2009). Só em 1652 abriu a primeira “loja de café” em Londres, e em 1683 em Viena (Clifford, 1985; ICO, 2010).

Pensa-se que em 1690 o director da Companhia das Índias Orientais Holandesas tenha levado sementes para a Ilha de Java, mas a germinação destas não teve sucesso e só em 1699 se conseguiu a propagação devido à transplantação de plantas originárias de Malabar (Ferrão, 2005; ICO, 2010).

Em 1706 foram transportados cafeeiros da ilha de Java para o Jardim Botânico de Amesterdão, e em 1714, o Burgomestre da Cidade de Amesterdão enviou a Luís XIV um cafeeiro que foi plantado no *Jardin des Plantes* em Paris (Ferrão, 2005).

Várias tentativas foram realizadas pelos franceses e pelos holandeses para introduzir o cafeeiro na América. Pensa-se que em 1723 três plantas foram entregues ao oficial da marinha M. Declieux, para as transportar para Martinica, e daí foram disseminadas para a América Central. De Amesterdão foram enviadas plantas para Suriname (1718) e Caiena (1722).

No Brasil a cultura foi introduzida pelo sargento-mor Francisco de Melo Palheta, em 1727, através de plantas levadas de Caiena (Clifford, 1985; Ferrão, 2009). Os ingleses foram os últimos a introduzir a cultura nas suas colónias, em 1730 na Jamaica (Clifford, 1985).

1.2. Enquadramento sistemático dos cafeeiros

A primeira descrição botânica do cafeeiro foi realizada por Jussieu, em 1713, na Academia de Ciências de Paris, que classificou a planta como *Jasminum arabicum laurifolia* por possuir flores aromáticas como as de jasmim, folhas como as do loureiro e ser originária das terras da Arábia. Em 1737, o botânico sueco Carolus Linnaeus denominou-a *Coffea arabica* criando um novo género *Coffea*, que mais tarde viria a ser incluído na família *Rubiaceae*. A classificação de A. Chevalier de 1947, dividia o género *Coffea* em 4 secções: *Paracoffea*, *Argocoffea*, *Mascarocoffea* e *Eucoffea*, estando na última secção incluídas as espécies com interesse económico, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (Davis *et al.*, 2006; Ferrão, 2009).

Actualmente os caracteres morfológicos continuam a ser utilizados na caracterização das espécies, o que levanta grandes dificuldades pois as plantas apresentam um elevado polimorfismo consoante as condições ecológicas onde se desenvolvem (Ferrão, 2009). *Coffea* é, em particular, um género complexo e de grande diversidade genética, no qual o processo de diferenciação das espécies ainda não evoluiu o suficiente de modo a criar verdadeiras barreiras ao cruzamento genético, o que é verificável pela facilidade com que são obtidos híbridos mesmo entre espécies que estão afastadas geograficamente. Desta forma, a sua taxonomia está sujeita a frequentes revisões resultantes de inovações introduzidas nos métodos modernos de biologia molecular que, em conjugação com os métodos de taxonomia clássicos, permitem um conhecimento mais aprofundado da variabilidade genética deste género (Ruas *et al.*, 2003). Na classificação mais recente, o género *Coffea* encontra-se inserido na família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae* e tribo *Coffeae*. Em 2006, Robbrecht e Manen reclassificaram a tribo *Coffeae* dividindo-a em duas subtribos: *Coffeinae*, que inclui os géneros *Coffea* e *Psilanthus*, e *Bertinae* (Davis *et al.*, 2007). Dentro do género *Coffea* foram criados ainda os seguintes três subgéneros: *Coffea*, *Baracoffea* e *Philanthopsis*. É no subgénero *Coffea* que se encontram as espécies *C. arabica* e *C. canephora* (Andreasen e Bremer, 2000; Davis *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2007).

1.3. Características gerais da espécie *C. arabica* e *C. canephora*

A espécie *C. arabica* é originária das zonas montanhosas da Etiópia e do planalto de Boma no Sudão, estando adaptada a altitudes entre 1300 e 1900 m (Ferrão, 2009). É a única espécie tetraplóide ($2n=4x=44$ cromossomas) e auto-fértil no género *Coffea*, apresentando no entanto um comportamento diplóide, o que possibilita o cruzamento com as restantes plantas do género (Carvalho, 1988; Herrera *et al.*, 2002; Pearl *et al.*, 2004). Pensa-se que esta espécie tenha surgido do resultado da hibridação entre *C. eugenoides* e *C. canephora* (Lashermes, 1999). Actualmente é cultivada em regiões de temperatura moderada na zona tropical e subtropical da América Latina, África Central e Oriental, Índia e Indonésia. (Ferrão, 2009; ICO, 2010). Comercialmente *C. arabica* produz sementes conhecidas como café Arábica e representou, no ano safra 2008/09, 64% da produção mundial de café (ICO, 2010).

A espécie *C. canephora* é originária da África Central e tem uma boa adaptação a altitudes inferiores a 1000 m (Wrigley, 1988). Tal como as restantes espécies do género *Coffea*, é diplóide e auto-estéril. Actualmente este café é cultivado na África Central e Ocidental, Ásia e Brasil (Ferrão, 2009, ICO, 2010). O café obtido a partir desta espécie é conhecido comercialmente como café Robusta e representou, no ano safra 2008/09, 34% da produção mundial de café (ICO, 2010).

As sementes do *C. arabica* são ovais, esverdeadas e mais achatadas, enquanto as do *C. canephora* são redondas, acastanhadas e mais pequenas. Após a torra, a bebida preparada com sementes de café Arábica é mais aromática, dependendo as suas características do local de origem e da tecnologia pós-colheita praticada, daí ser designado por “café de chávina”. O café Robusta confere mais corpo e poder estimulante à bebida por apresentar, respectivamente, teores mais elevados de sólidos solúveis e de cafeína. Desta forma, o café Robusta é muito utilizado na confecção de lotes juntamente com o café Arábica e na produção de café solúvel (Almeida, 2008/09; Ferrão, 2009).

1.4. Importância económica da cultura do cafeeiro

O café é um dos produtos comerciais mais importantes no mercado internacional, tendo o valor cumulativo das suas exportações em 2009 atingido os 15,4 mil milhões de \$US. Apesar de o café ser visto como uma mercadoria transaccionável pelos países desenvolvidos, este produto é uma fonte de rendimento crucial em países em vias de desenvolvimento, chegando a ser a sua principal fonte de rendimento (Pearl *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2009).

Segundo os dados da ICO (Organização Internacional de Café), a produção mundial de café no ano/safra 2008/09 foi de 128.790 milhões de sacas (60 kg/saca), verificando-se um aumento de aproximadamente 9% relativamente ao ano anterior, e de 0,7% ao de 2006/07, superando desta forma os resultados obtidos nos últimos quatro anos (Figura 1).

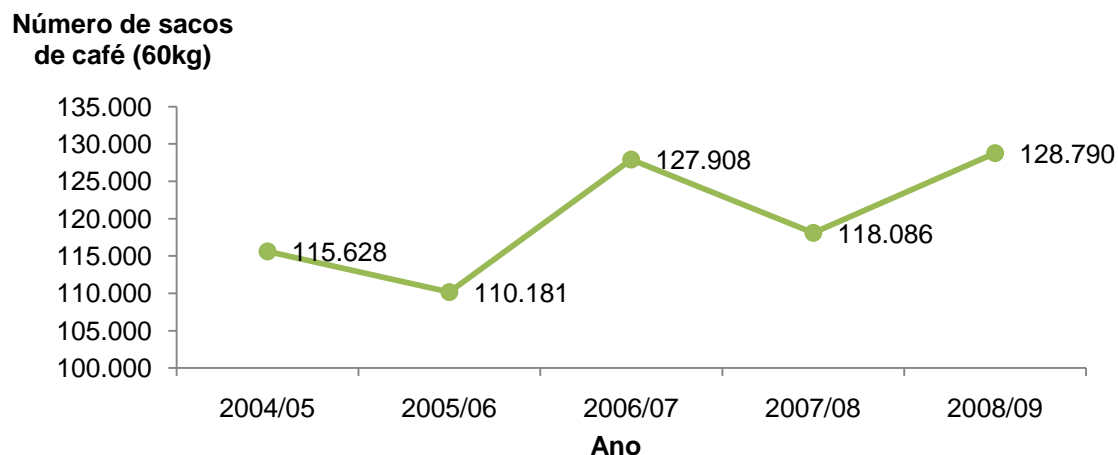


Figura 1 - Produção mundial de café desde 2004/05 a 2008/09 (fonte: ICO)

Em 2008/09 o continente com maior produção foi a América (60,3%), seguindo-se a Ásia (27,7%) e a África (11,1%), sendo a Oceânia o continente menos produtivo (0,9%). O país com maior produção de café foi o Brasil (35,7%), seguindo-se o Vietname e a Colômbia, com 12,4% e 8,2% respectivamente (Figura 2) (ICO, 2010).

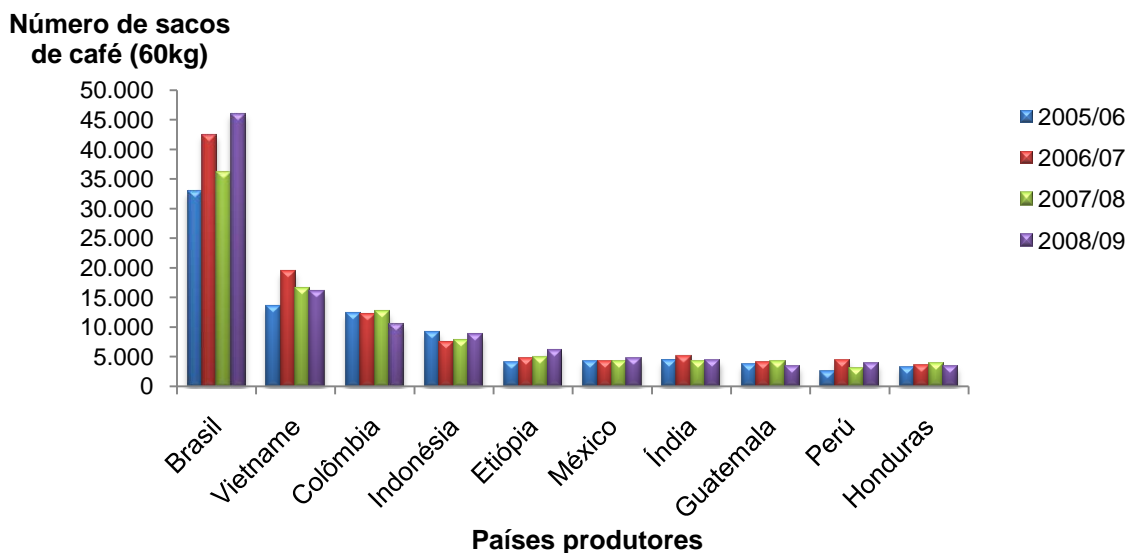


Figura 2 – Principais países produtores de café (2005/6 a 2008/9) (fonte: ICO)

Apesar de os EUA apresentarem um consumo bruto mais elevado, é nos países nórdicos europeus que se verificou o maior consumo de café *per capita* entre 2005 e 2008, representando Portugal um consumo de 4,05 Kg/per capita (Figura 3).

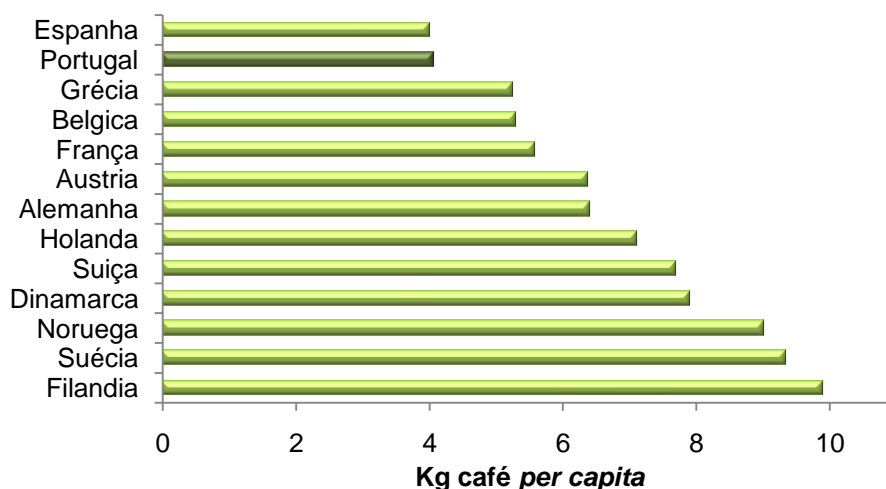


Figura 3 – Principais países consumidores de café na Europa (2005/6 a 2007/8) (fonte: FAO)

1.5. Da planta à chávana: uma pequena síntese

O produto do cafeeiro mais valorizado comercialmente é a sua semente, com a qual se prepara a bebida de café, tão apreciada na sociedade actual. A semente é obtida a partir do fruto que, após tratamento pós-colheita, dá origem ao café comercial (Figura 4).

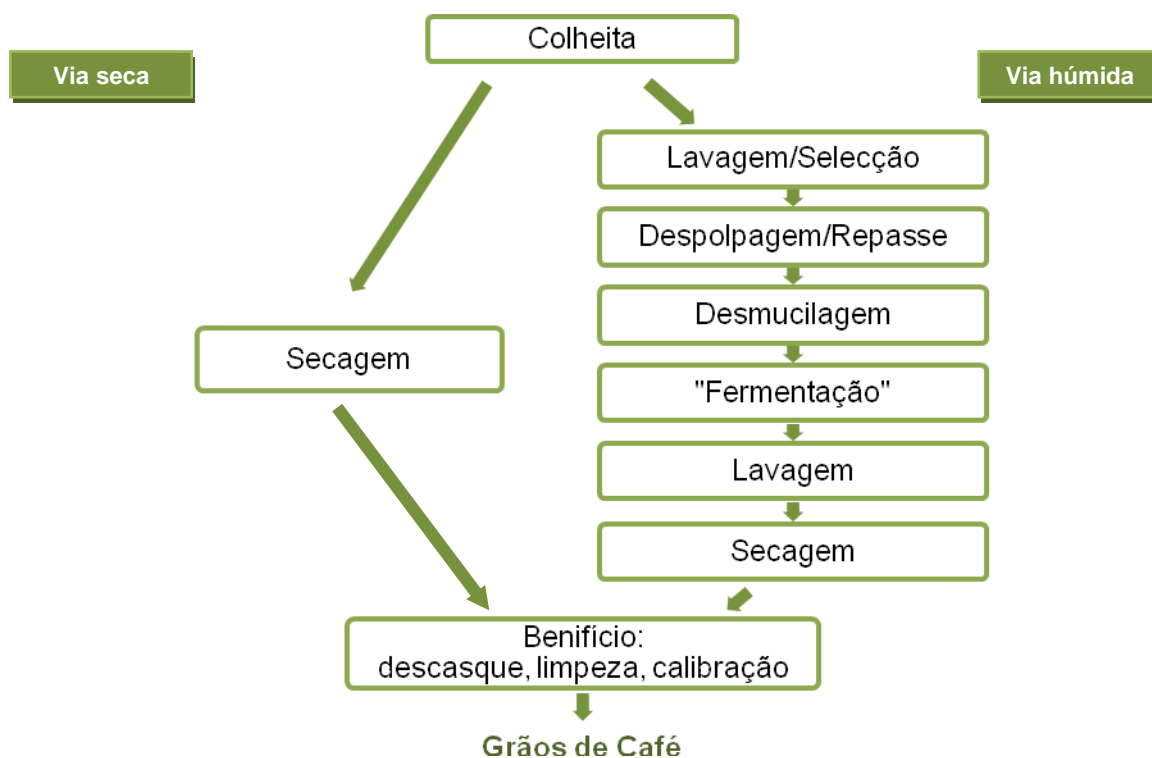


Figura 4 - Representação esquemática geral da tecnologia pós-colheita do café

Na via seca, a secagem deve ser realizada logo após a colheita de forma a evitar que os frutos se degradem devido aos açúcares da polpa. Os frutos são geralmente descarregados num terreiro e espalhados numa camada fina. A limpeza dos frutos é realizada ao longo do processo de secagem. Os frutos verdes e demasiado maduros não são separados, constituindo um só lote. A secagem pode ser natural, efectuada directamente ao sol, ou artificial, em secadores “mecânicos” pelos quais se faz passar uma corrente de ar quente. O produto resultante desta tecnologia é o café “coco” (também designado por “mabuba”), em que os frutos ficam negros e com a polpa mirrada devido à perda de água (Almeida, 2008/09; Ferrão, 2009).

A via húmida inicia-se com uma etapa de lavagem e selecção na qual os frutos são descarregados para um recipiente ou tanque de água. Os frutos sãos, mais densos, vão ao fundo. À superfície é recolhido o “café bóia”, constituído pelos frutos verdes, os demasiado maduros e os moka (apenas com uma semente), que são posteriormente encaminhados para a via seca. Os frutos sãos são retirados por um sistema de sifão, devido à diferença de pressão hidráulica, e são conduzidos para a despulpagem e repasse. Nesta etapa retira-se o epicarpo e mesocarpo, ficando a semente envolvida apenas pelo endocarpo, e deixa-se o mínimo de polpa possível. De seguida procede-se à desmucilagem, para retirar a mucilagem ainda aderente ao endocarpo e que dificulta a secagem e atrai microrganismos. A fermentação é o método de desmucilagem mais comum e tem como principal objectivo degradar as substâncias pécticas da mucilagem, originando o café “pergaminho”. Este café é então sujeito a uma lavagem, para dissolver e arrastar os restos de mucilagem, e de seguida a uma secagem, com o objectivo de reduzir o teor de água do café “pergaminho” e facilitar o posterior descasque. A secagem do café em pergaminho pode, tal como na via seca, ser realizada naturalmente ou em secadores artificiais (Almeida, 2008/09; Ferrão, 2009).

O benefício do café “coco” e do café “pergaminho” começa com o descasque, seguindo-se um conjunto de operações com o objectivo de limpar e separar os grãos pela sua forma, dimensão e defeito, de modo a obter lotes com maior qualidade e de apresentação mais homogénea. O café comercial designado de “*mild*” (suave) ou “lavado” é obtido por via húmida, e o “café de terreiro” por via seca (Almeida, 2008/09).

Na indústria torrefactora, o café recebido é sujeito a uma limpeza e calibração antes de seguir para a torra, para desenvolver o *flavour* característico do café, e depois pode ser comercializado em grão ou pode seguir para uma etapa de moenda. Na indústria do café solúvel, o café torrado moído é sujeito a uma extracção com água, seguindo-se a concentração e secagem do extracto (Almeida, 2008/09; Ferrão, 2009).

2. A ferrugem alaranjada – *Hemileia vastatrix*

2.1. Origem e distribuição geográfica

Este fungo foi assinalado pela primeira vez em 1861 em cafeeiros na região de Nyanza, perto do Lago Vitória (Quénia). Em 1869, provocou prejuízos enormes no Sri Lanka, de tal ordem que a cultura do café foi substituída pela cultura do chá (Wrigley, 1988; Ferrão 2009). A primeira referência à presença do fungo no continente africano foi feita pelo fitopatologista Kaden entre 1929 e 1930.

Em Moçambique foi detectada pela primeira vez em 1939 por Afonso Cardoso, mas em Angola só foi detectada em 1966, onde causou enormes prejuízos nesse mesmo ano. A chegada do fungo ao Brasil foi um pouco mais tardia, sendo que o primeiro registo data de 1970, difundindo-se até Equador e México (1981), Colômbia (1983), Papua Nova Guiné e Jamaica (1986) (Kushalappa, 1989; Ferrão, 2009).

2.2. Importância económica

A ferrugem alaranjada é a principal doença do cafeeiro Arábica a nível mundial, constituindo uma limitação na sua área de cultivo (Prakash *et al.*, 2004; Ferrão, 2009). Foi estimado que o prejuízo causado pelo impacto desta doença possa assumir valores na ordem de 1 mil milhões a 2 mil milhões de dólares americanos, devido a perdas na produção mundial de 15 – 20% se não forem tomadas medidas preventivas (van der Vossen, 2001).

Esta doença foi considerada, por H. David Thurston (1998), uma das sete maiores doenças do último século, responsável pela devastação da cultura do café em países como o Sri Lanka, Indonésia e Filipinas. Também na Índia esta doença representa uma grande ameaça para a cultura do café, estimando-se uma perda de 70%, caso não sejam tomadas as medidas de controlo adequadas (Prakash *et al.*, 2004). A capacidade fotossintética das folhas infectadas diminui resultando no enfraquecimento do cafeeiro, reduzindo o seu crescimento vegetativo e consequentemente causar perdas na produção (Kushalappa e Eskes, 1989).

2.3. Taxonomia

O género *Hemileia* foi descrito pela primeira vez em 1869 por Berkeley e Broome. O seu nome é baseado na forma dos uredósporos, que possuem uma face lisa e outra face equinolada (*Hemi* significa meio, *Leia* significa lisa) (Rodrigues Jr, 1985). A classificação actualmente mais aceite é (CABI Database, 2010):

Reino – *Fungi*

Filo – *Basidiomycota*

Classe – *Pucciniomycetes*

Sub-classe – *Incertae sedis*

Ordem – *Pucciniales*

Família – *Incertae sedis*

Gênero – *Hemileia*

Espécie – *Hemileia vastatrix*

2.4. Sintomatologia

A presença da ferrugem alaranjada manifesta-se pelo aparecimento de manchas circulares amarelo-alaranjadas e pulverulentas, devido aos soros do fungo, que podem atingir 1 cm ou mais de diâmetro, na página inferior da folha (Rodrigues Jr, 1985; Rijo, 1990; Silva, 2006) (Figura 5). Na página superior aparecem áreas cloróticas, sem esporos, que correspondem às pústulas visíveis na página inferior (Rodrigues Jr, 1985). No fim do ataque, as lesões têm um aspecto esbranquiçado que progride do centro para a periferia, tornando-se escuras com o tempo.



Figura 5 - Página inferior da folha do cafeeiro com pústulas de soros uredospóricos de cor alaranjada.

2.5. Ciclo de vida

A ferrugem alaranjada apresenta três tipos de estruturas esporogênicas no seu ciclo de vida: uredósporos, teleutósporos e, com menos frequência, basidiósporos (Figura 6) (Rodrigues Jr *et al.*, 1980; Rodrigues Jr, 1985).

Os uredósporos são unicelulares dicarióticas e representam a fase assexuada, sendo os responsáveis pela dispersão da doença infectando sucessivamente as folhas do cafeeiro (Rodrigues Jr *et al.*, 1980; Rodrigues Jr, 1985; Fernandes *et al.*, 2009).

Os teleutósporos aparecem raramente em condições climáticas particulares como baixas temperaturas e chuva moderada (Fernandes *et al.*, 2009). Estes germinam *in situ*, sem período de dormência, originando um promicélio, o que não acontece com os uredósporos, na extremidade do qual se desenvolvem os basidiósporos (Rodrigues Jr *et al.*, 1980; Fernandes *et al.*, 2009).

Os basidiósporos não infectam o cafeeiro, sendo alguns autores da opinião que a *H. vastatrix* se trata de um fungo heteróico. No entanto, até hoje desconhece-se a existência de um hospedeiro para a fase sexuada da *H. vastatrix*. (Rodrigues Jr *et al.*, 1980; Fernandes *et al.*, 2009). Como também os basidiósporos germinam *in situ*, outros autores defendem que, qualquer que seja a sua função, esta não deve ter lugar muito longe do local de germinação, ou seja, que se deve realizar na própria planta (Rodrigues Jr *et al.*, 1980).

No campo e em condições de estufa têm sido observados teleutósporos uredinóides, ou seja, teleutósporos morfologicamente semelhantes a uredósporos, mas que germinam como teleutósporos (Rodrigues Jr *et al.*, 1980; Rodrigues Jr, 1985). Pensa-se que estes esporos serão uma adaptação recente da espécie selvagem de *H. vastatrix* após ter emergido de um habitat mais húmido para um clima mais seco e mais sazonal (Fernandes *et al.*, 2009).

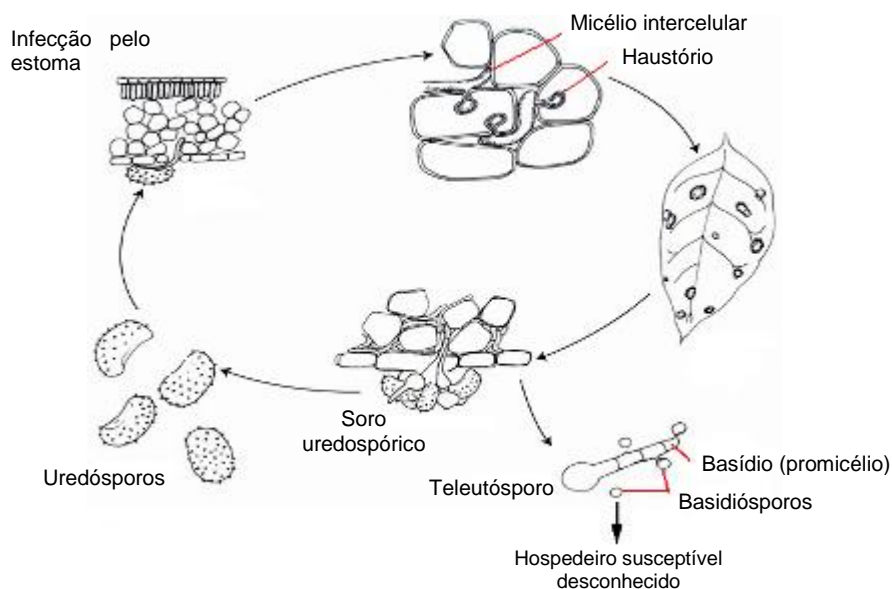


Figura 6 - Ciclo de vida da *Hemileia vastatrix* (fonte: www.apsnet.org)

2.6. Processo de infecção

A germinação dos uredósporos de *H. vastatrix* dá-se na presença de água líquida e a uma temperatura óptima de 24°C, podendo esta oscilar entre os 15°C e os 30°C. Os uredósporos germinam na página inferior da folha, formando um tubo germinativo, na extremidade do qual se diferencia o apressório sobre o estoma. O apressório, considerado a primeira estrutura de infecção, emite uma hifa de penetração que vai crescer para dentro da câmara sub-estomática. Esta hifa ramifica-se em duas hifas laterais mais grossas, formando-se uma estrutura semelhante a uma âncora. Na extremidade de cada ramificação da âncora, origina-se uma hifa designada por célula-mãe do haustório, que se dirige para as células subsidiárias do estoma onde se formam os primeiros haustórios (hifas intracelulares) (Figura 7).

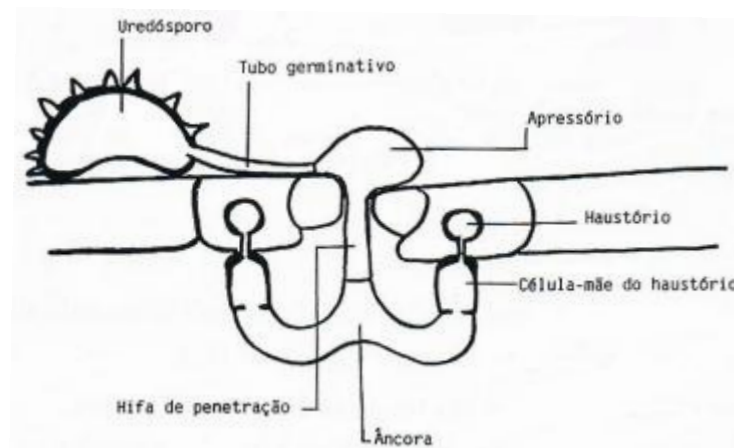


Figura 7 - Primeiras fases do processo de infecção por *Hemileia vastatrix* (esquema cedido por Silva, M.C.)

Cerca de 21 dias após a inoculação o fungo continua o seu crescimento com formação de mais hifas intracelulares e haustórios no mesofilo. A esporulação ocorre na zona de penetração do fungo, por onde sai um soro uredospórico em forma de *bouquet* (Rodrigues Jr *et al.*, 1978; Rodrigues Jr *et al.*, 1985; Rijo *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008).

2.7. Meios de luta

O objectivo dos tratamentos consiste em reduzir ao mínimo a quantidade de inóculo disponível que origina infecções na estação das chuvas (Rodrigues Jr, 1985).

Um dos principais cuidados é manter as plantações em boas condições sanitárias, no entanto, para um controlo mais eficaz da ferrugem alaranjada é necessário recorrer à luta química.

Um dos tipos de fungicidas aplicados são os cúpricos. Como o fungo só é vulnerável até ao momento de penetração nos tecidos foliares, é essencial aplicar o fungicida de maneira a permanecer na parte de trás das folhas mesmo na época das chuvas, e aplicar antes da chegada do fungo (Rodrigues Jr, 1985; Wrigley, 1988; Eskes, 1989). Esta solução não é economicamente viável para muitos dos países produtores devido aos elevados custos dos tratamentos, baixos rendimentos unitários e à topografia de muitas plantações (Rodrigues Jr, 1985).

Com a aplicação de fungicidas sistémicos consegue-se também um bom controlo sobre o fungo, sendo que a maior desvantagem é a possibilidade de causar uma severa desfoliação das plantas (Eskes, 1989).

Dada a importância económica que o café assumiu a nível mundial, existe um grande investimento científico na selecção e no melhoramento para a obtenção de cultivares bem adaptadas ecologicamente e resistentes a pragas e doenças, como no caso da *H. vastatrix*, mantendo uma boa produtividade e boas características organolépticas dos grãos (Prakash *et al.*, 2004; Silva, 2006; Ferrão, 2009).

3. Interacção cafeeiro – ferrugem alaranjada

A escala de classificação qualitativa dos tipos de reacção do cafeeiro e a *H. vastatrix* utilizada no CIFC foi elaborada pelo Prof. Branquinho D'Oliveira (1954-57) (Quadro 1). Esta escala permite caracterizar os grupos fisiológicos de cafeeiros e diferenciar raças fisiológicas de ferrugem.

Quadro 1 - Escala de classificação qualitativa dos tipos de reacção dos cafeeiros à *H. vastatrix* (Branquinho D'Oliveira, 1954 - 57)

<i>i</i>	Imune, sem quaisquer sinais que indiquem que se deu a infecção
<i>fl</i>	"flecks", reacção de hipersensibilidade, às vezes difícil de observar macroscopicamente mas visível à lupa
;	Pontuações necróticas visíveis macroscopicamente, situadas no ponto de penetração da ferrugem ou dispersas pela área de infecção
<i>t</i>	Pequena tumefacção no ponto de penetração da ferrugem, bem visível à lupa
0	Clorose mais ou menos intensa, na área de infecção, às vezes acompanhada de pequenas necroses, mas sem formação de soros uredospóricos
1	Raros soros uredospóricos sempre muito pequenos, por vezes só distinguíveis à lupa, em áreas predominantemente cloróticas, por vezes acompanhadas de necroses
2	Pústulas uredospóricas pequenas ou médias difusas, mas bem visíveis macroscopicamente, em áreas intensamente cloróticas
3	Pústulas uredospóricas pequenas ou médias rodeadas de clorose
4	Grandes pústulas uredospóricas sem verdadeira hipersensibilidade, mas podendo apresentar uma leve clorose na margem das infecções
X	Reacção heterogénea, pústulas uredospóricas de tamanho muito variável, incluindo na aparência de diversos tipos ou graus de infecção com expressões de compatibilidade e incompatibilidade

As expressões fenotípicas associadas à resistência (R) são *i*, *fl*, ; e *t*, sendo a expressão mais comum o "fleck" associado à tumefacção (*flt*). As reacções 1 e 2 são designadas, respectivamente, por moderadamente resistente e moderadamente susceptível, e as reacções 3 e 4 como susceptível (S) (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt, 1981).

3.1. Raças de *Hemileia vastatrix*

A primeira caracterização de raças fisiológicas de *H. vastatrix* foi realizada por Mayne na Índia, em 1932, que descreveu 4 raças de ferrugem. Posteriormente, os trabalhos realizados no CIFC por Branquinho D'Oliveira e os seus colaboradores permitiram identificar até hoje cerca de 45 raças fisiológicas que se distinguem pelo seu espectro de infecção em relação a 18 cafeeiros diferenciadores (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt, 1981; Bettencourt e Rodrigues Jr, 1988, Várzea e Marques, 2005). Os diferenciadores são clones de cinco plantas da espécie tetraplóide *C. arabica*, sete plantas de híbridos tetraplóides de *C. arabica* x *C. canephora* e *C. arabica* x *C. liberica*, e de seis plantas das espécies diplóides *C. canephora*, *C. congensis*, *C. excelsa* e *C. racemosa* (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt e Rodrigues Jr, 1988, Várzea e Marques, 2005). Devido ao elevado grau de especiação da ferrugem, actualmente estes diferenciadores não são suficientes para a caracterização de algumas novas raças virulentas que têm aparecido (Várzea e Marques, 2005).

3.2. Grupos fisiológicos de *Coffea* spp.

Os cafeeiros são classificados em grupos fisiológicos de acordo com a expressão fenotípica em relação a determinadas raças de *H. vastatrix*. Actualmente conhecem-se cerca de 40 grupos fisiológicos diferentes, designados por letras e números (Sera *et al.*, 2007).

As cultivares de *C. arabica* mais comuns pertencem ao grupo E e sendo susceptíveis à maioria das raças de ferrugem. As restantes cultivares estão distribuídas pelos grupos β , D, α , C, γ , J, L, I e W, cuja gama de susceptibilidade à ferrugem varia de muito susceptíveis (grupo β) a pouco susceptíveis (grupo W). As plantas diplóides susceptíveis a todas as raças encontram-se no grupo F, e as resistentes a todas as raças no grupo A (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt, 1981; Bettencourt e Rodrigues Jr, 1988). Neste último encontra-se o Híbrido de Timor (HDT), considerado um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, e os híbridos resultantes de cruzamentos sucessivos do HDT com outras variedades, como o Catimor, cruzamento com o Caturra, e o Sarchimor, cruzamento com o Villa-Sarchi, ambos preparados no CIFC. Os grupos Q, P, K e B englobam plantas diplóides com resistência parcial (Bettencourt e Rodrigues, 1988).

3.3. Hereditariedade da resistência de *H. vastatrix* em *Coffea* spp

Os primeiros estudos de resistência de *H. vastatrix* em cafeeiro foram realizados por Mayne (1932, 1935) na Índia. Inicialmente Mayne descobriu a presença de dois factores responsáveis pela resistência de algumas plantas. Posteriormente, os trabalhos desenvolvidos por Noronha-Wagner e Bettencourt (1967) possibilitaram a identificação de cinco genes dominantes designados S_H1, S_H2, S_H3, S_H4 e S_H5 (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt, 1981), sendo que os genes S_H2 e S_H3 correspondem aos dois factores caracterizados por Mayne. Posteriormente, com a descoberta do Híbrido-de-Timor, foi possível identificar mais genes de resistência, os S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9 (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt e Rodrigues Jr, 1988). Assim sendo, sabe-se que os genes S_H1, S_H2, S_H4 e S_H5 são provenientes de *C. arabica*, o gene S_H3 provém de *C. liberica*, e os S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9 de *C. canephora* (Bettencourt e Rodrigues Jr, 1988).

Os estudos desenvolvidos pelo CIFC demonstraram que se aplica à interacção cafeeiro-ferrugem a teoria gene-a-gene de Flor (1942). Esta teoria determina que “para cada gene que condiciona a resistência no hospedeiro (*R*) existe um gene complementar que condiciona a avirulência (*avr*) no agente patogénico”. A interpretação actual da teoria gene-a-gene é que os produtos dos genes *avr* dos fungos interagem, directa ou indirectamente, com o produto dos genes *R* codificados pelo hospedeiro (Heath, 1997; Heath 2000b; Silva, 2002; Peck, 2003; Agrios, 2005; Glazebrook, 2005; Vlot *et al.*, 2009).

Tendo por base esta teoria, foram identificados 9 genes de resistência (S_H1 a S_H9) e inferidos 9 genes de virulência em *H. vastatrix* (v1 a v9) (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt, 1981).

4. Considerações gerais sobre a resistência e susceptibilidade das plantas

No seu ambiente natural as plantas estão sujeitas ao ataque por diversos agentes patogénicos como fungos, bactérias, vírus e nemátodes, tendo desenvolvido um eficiente sistema de reconhecimento que vai activar uma complexa rede de respostas de defesa, sendo a doença a excepção e não a regra (Tamogami, 1998; Mysore, 2004; Glazebrook, 2005; Bari e Jones, 2009).

O elaborado sistema de defesa das plantas pode ser classificado em constitutivo (pré-existente) ou induzido. A resistência constitutiva é uma forma passiva de defesa e ocorre mesmo sem a acção de agentes agressores. Nesta encontram-se as barreiras físicas, baseadas nas características de superfície das plantas (como a quantidade e qualidade das ceras presentes na cutícula, o tamanho, a localização e a forma do estoma, etc.) e as

barreiras químicas, caracterizadas por substâncias antimicrobianas produzidas nas células antes da infecção (como péptidos, compostos fenólicos, saponinas e alcalóides) (Mysore, 2004; Agrios, 2005; Silva *et al.*, 2006).

As defesas induzidas envolvem o reconhecimento do agente patogénico por parte da planta, através da detecção dos eliciadores (moléculas do agente patogénico). Após o reconhecimento inicia-se o processo de sinalização que resulta em diversos mecanismos de defesa, como a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), a reacção de hipersensibilidade (HR), alterações estruturais ao nível da parede celular, produção de proteínas relacionadas com a patogenicidade (proteínas PR), acumulação de fitoalexinas, etc; resultando na restrição do crescimento do agente patogénico (Heath, 2000a, Mysore e Ryu, 2004; Silva *et al.*, 2006). No caso da resistência específica à raça do agente patogénico, se a planta tem a capacidade de o reconhecer, a interacção é dita 'incompatível'. Na ausência do reconhecimento do agente patogénico, a planta é susceptível e a interacção é compatível (Mysore e Ryu, 2004; Glazebrook, 2005; Vlot *et al.*, 2009). O tempo que a planta leva a reconhecer um microrganismo, associado à rápida e eficaz indução de uma resposta de defesa, parece ser a diferença fundamental entre resistência e susceptibilidade (Van Loon *et al.*, 2006; Bari e Jones, 2009).

4.1. Compostos sinalizadores

Após o reconhecimento dos agentes patogénicos, o processo de sinalização inicia-se conduzindo à activação de uma série de sinais na membrana plasmática que induzem uma rede complexa de moléculas de sinalização, tais como o ácido salicílico, o ácido jasmónico e o ácido abcísico (Figura 8) (Silva *et al.*, 2006; Bari e Jones, 2009). Esta sinalização conduz a diversas alterações celulares como o fluxo interno de iões de cálcio (Ca^{2+}), a produção de ROS, etileno, entre outros. Diversas enzimas têm sido referidas por desempenharem um papel importante nesta etapa como as NADPH oxidases, peroxidases apoplásticas e fosfoproteínas (Heath, 2000a; Agrios, 2005).

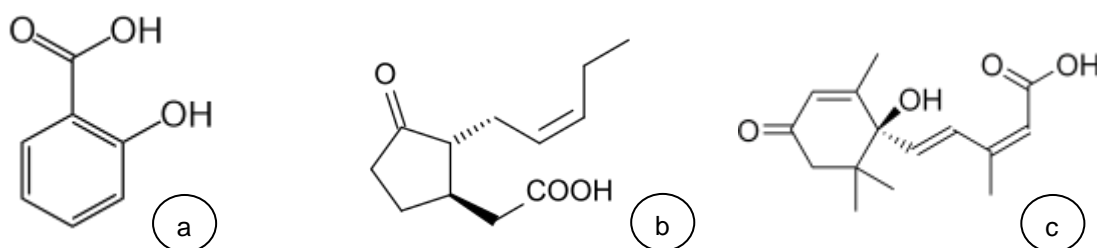


Figura 8 - Estrutura química do ácido salicílico (a), ácido jasmónico (b) e ácido abcísico (c)

O ácido salicílico (SA) pode ser produzido através de duas vias enzimáticas distintas, que requerem como metabolito primário o ácido corísmico. Uma é a síntese directamente a partir do ácido corísmico, a outra é através da conversão do ácido corísmico em fenilalanina, que pela actividade da enzima fenilalanina amoníaco-liase (PAL) é convertido em ácido cinâmico. O SA produzido pode ainda ser convertido em SA O- β -glucosilado (SAG), metilsalicilato (MeSA) e ácido 2,5-dihidroxibenzóico (ácido gentísico) (Vlot *et al.*, 2009).

O SA desempenha diversas funções nas plantas como da indução a floração, inibição da germinação das sementes, fecho dos estomas ou retardar a senescência, mas sobretudo tem sido sugerido como tendo uma função crucial na defesa das plantas, estando envolvido na activação de respostas de defesa contra agentes patogénicos biotróficos e hemi-biotróficos, assim como na indução da resistência sistémica adquirida (SAR) (Kunkel e Brooks, 2002; Glazebrook, 2005; Van Loon *et al.*, 2006; Zhou, 2008; Bari e Jones, 2009; Vlot *et al.*, 2009). Pensa-se que nas interacções gene-a-gene a resistência esteja associada à activação de vias dependentes do SA que vão induzir a expressão de proteínas PR e facilitar a acumulação de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) durante o choque oxidativo (Vlot *et al.*, 2009). O choque oxidativo tem por um lado um efeito antimicrobiano directo sobre o agente patogénico, e por outro pode funcionar como sinal activando um leque de respostas de defesa (Heath, 2000b; Glazebrook, 2005; Silva *et al.*, 2006).

A relação encontrada entre o SA, a morte celular e o H₂O₂ levaram a considerar a hipótese de o processo de sinalização não ser linear. Após a infecção pelo agente patogénico, o aumento inicial de H₂O₂ conduz à síntese de SA, que por sua vez resulta no choque oxidativo, morte celular e expressão de genes de defesa. Por outro lado o SA potencia a produção de H₂O₂, que activa a síntese de mais SA (através da expressão de genes), intensificando a morte celular. Entre os genes expressos estão os responsáveis pela síntese de proteínas relacionadas com a patogenicidade (proteínas PR), o *npr1* (*non-expressor of pathogenesis related genes 1*), o *eds* (*enhanced disease susceptibility*), o *sid2* (*SA induction deficient 2*) e a *pad4* (*phytoalexin deficient 4*) (Kunkel e Brooks, 2002; Glazebrook, 2005; Vlot *et al.*, 2009).

Diversos estudos mostram que os níveis de SA aumentam em tecidos infectados e que aplicações exógenas resultam na indução de genes *pr* e no aumento da resistência a uma ampla gama de agentes patogénicos (Yalpani *et al.*, 1991; Reymond e Farmer, 1998; Kunkel e Brooks, 2002; Glazebrook, 2005; Bari e Jones, 2009; Vlot *et al.*, 2009).

O ácido jasmónico (JA) é formado por uma cadeia de doze carbonos, sintetizado a partir do substrato de ácido linoleico (C18) pelo metabolismo do octadecanóide (Creelman, 1992; Reymond e Farmer, 1998; Kunkel e Brooks, 2002).

O JA e o seu metiléster (MeJA) têm actividade de fitohormonas e são reconhecidos como moléculas sinalizadoras sintetizadas pelas plantas em resposta a ferimentos, ataque de herbívoros e de agentes patogénicos. Estas moléculas têm também vários efeitos fisiológicos nomeadamente inibir o crescimento vegetal, regular a expressão de genes que codificam proteínas de reserva vegetativa e inibidores de proteases, aumentar o nível dos transcritos e da actividade de lipoxigenase, provocar a clorose foliar promovendo deste modo a senescência, etc (Creelman, 1992; Kunkel e Brooks, 2002; Glazebrook, 2005; Zhou, 2008; Bari e Jones, 2009; Jaiti, 2009). Diversos estudos têm demonstrado que as concentrações de JA aumentam localmente em resposta à infecção do agente patogénico, e que as aplicações exógenas de JA induzem a expressão de genes relacionados com respostas de defesa. Alguns desses genes são *coi1* (coronatine insensitive 1), *jaz* (jasmonate ZIM-domain), *jar1* (jasmonic acid resistant 1) e *mpk4* (mitogen-activated protein kinase 4) (Glazebrook, 2005; Bari e Jones, 2009; Jaiti, 2009). A enzima celulase sintetase localizada na parede celular das plantas parece estar envolvida na regulação dos níveis de JA, uma vez que em mutantes de *Arabidopsis* (*cev1*) que não possuem esta enzima os níveis constitutivos de JA são mais elevados assim como a expressão de genes dependentes do JA (Tamogami, 1998; Glazebrook, 2005).

O ácido abscísico (ABA) é uma hormona vegetal relacionada com a protecção das plantas ao stress hídrico, estímulo da abscisão, inibição da germinação de sementes e do desenvolvimento dos gomos. Este composto ajuda ainda no crescimento e desenvolvimento do caule. Podem também actuar potenciando a indução de biossíntese proteica relacionada com o MeJA. Contudo a função do ABA na defesa das plantas parece ser complexa e ainda pouco conhecida (Koorneef *et al.*, 2008; Bari e Jones, 2009). Recentemente foi reportado que a aplicação de ABA suprime a indução de SAR, o que indica que existe um antagonismo entre SAR e a sinalização do ABA (Yasuda, 2008). Contudo, o ABA também foi referido como um regulador de defesa positivo ao provocar o encerramento dos estomas para actuar como uma barreira de defesa contra alguns agentes patogénicos (Melotto, 2006). Apesar das variações nas concentrações de ABA serem mais subtis do que as de SA e de JA, sabe-se que ele é importante na activação das defesas da planta através da transcrição e reprogramação do seu metabolismo. Foi demonstrado que induz parcialmente a resistência por accionar a deposição de calose, activar a produção de ROS e regular a expressão dos genes responsáveis pela defesa (factores de transcrição) (Bari e Jones, 2009).

É devido ao *cross-talk* entre as diferentes vias de sinalização que se dá a expressão de genes relacionados com a defesa das plantas. Este *cross-talk* pode ajudar a planta a dar prioridade a activação de uma determinada via. A sinalização pela via do SA é geralmente antagonista da via do JA, por processos que estão parcialmente dependentes dos genes *npr1*, *ssi2*, *mpk4* e dos factores de transcrição WRKY, embora já tenham sido observadas interações sinergistas entre as duas vias (Kunkel, 2002; Glazebrook, 2005; Vlot *et al.*, 2009). A rede de sinalização de defesa activada por cada planta está dependente da natureza do agente patogénico, isto é, a sinalização do SA é mais utilizada contra agentes patogénicos biotróficos, e as respostas dependentes da sinalização do JA actuam essencialmente contra os necrotróficos e insectos (Reymond e Farmer, 1998; Glazebrook, 2005; Koorneef *et al.*, 2008; Bari e Jones, 2009; Jaiti, 2009; Vlot *et al.*, 2009). Embora o antagonismo entre o SA e o JA seja bidireccional, a principal direcção de regulação tende para a repressão do JA pela via dependente do SA (Vlot *et al.*, 2009).

Estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* vieram comprovar que os genes *eds5* e *sid2* parecem estar directamente envolvidos na síntese do SA, enquanto os genes *eds1*, *eds4* e *pad4* regulam a sua produção. Mutantes *eds4* e *pad4* são incapazes de acumular SA e apresentaram um aumento de expressão dos genes dependentes do JA (Glazebrook, 2005). Os genes *coi1* e *mpk4* aparecem cedo no processo de sinalização do JA pois mutações nestes genes em *A. thaliana* indicam o bloqueio da via de sinalização do JA, e mutantes *mpk4* constitutivamente expressam genes dependentes do SA (Kunkel e Brooks, 2002). Pensa-se que os genes *fad3/7/8* (*fatty acid desaturase*) estejam envolvidos na produção de JA e que o *ssi2* (*supressor of SA insensitivity 2*) regule o *cross-talk* entre o SA e o JA (Glazebrook, 2005). Estudos realizados na planta de tabaco provaram que o tratamento com eliciadores que activam a sinalização pela via do JA resultaram na inibição da expressão de genes dependentes do SA, como é o caso do *mpk4*, *coi1* e *ssi2* (Kunkel e Brooks, 2002; Glazebrook, 2005). Na figura 9 está representado um modelo de defesa envolvendo o SA e o JA.

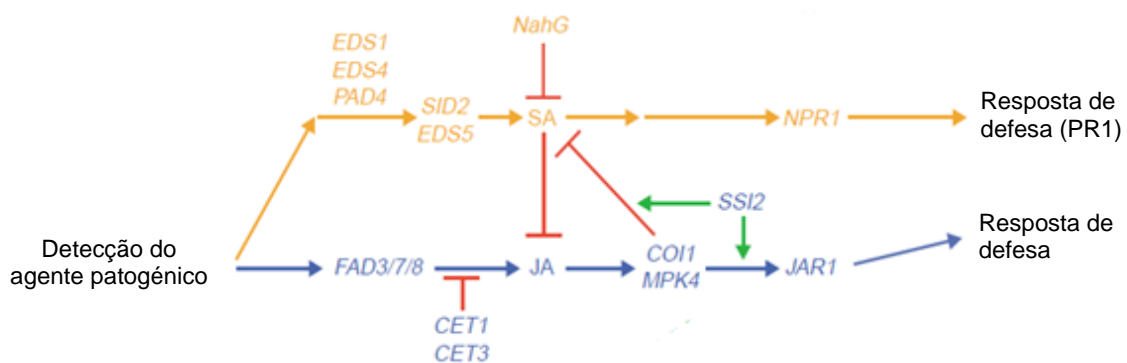


Figura 9 - Esquema representativo do *cross-talk* entre o SA e o JA. As interações sinérgicas estão representadas a verde e as interações antagonistas a vermelho (fonte: Kunkel e Brooks, 2002).

Mutantes de *Arabidopsis*, tabaco e arroz, que possuem o gene *NahG* vieram provar que o SA é necessário para a expressão dos genes como *pr1*. Este gene é responsável por regular a acção da hidrolase que converte o SA em catecol, resultando na incapacidade de acumular SA, aumentando a susceptibilidade a vários agentes patogénicos (Kunkel e Brooks, 2002; Glazebrook, 2005; Vlot *et al.*, 2009). Mais recentemente verificou-se que a transcrição do factor WRKY70 mostrou ser necessária para a expressão da *pr1*, sendo dependente da presença do *npr1*, e reprimindo a indução de genes do JA (Glazebrook, 2005; Koorneef *et al.*, 2008).

Em relação ao ABA, sabe-se que é necessário na biossíntese do JA e na expressão de genes relacionados com o JA, e como tal pode interferir indirectamente na sinalização pelo SA (Vlot *et al.*, 2009). Mas como o ABA está envolvido em processos de sinalização em stress biótico e abiótico, o *cross-talk* entre ele e os restantes mecanismos moleculares permanece por esclarecer (Bari e Jones, 2009).

4.2. Interacção *C. arabica* – *H. vastatrix*

A HR é a manifestação mais comum de resistência em interacções gene-a-gene, como é o caso da cafeeiro-ferrugem, e caracteriza-se pela rápida morte celular programada no local de infecção, restringindo deste modo o crescimento do agente patogénico. Esta resposta de defesa é particularmente eficiente contra microrganismos biotróficos, como as ferrugens, que dependem das células vivas do hospedeiro para a sua sobrevivência (Heath, 2000b; Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006; Glazebrook, 2005; Vlot *et al.*, 2009). Estudos citológicos mostraram que, nas interacções incompatíveis cafeeiro-ferrugem, a HR está associada ao encapsulamento dos haustórios com calose e celulose, à deposição de fenóis, à lenhificação das paredes celulares e à hipertrofia das células da planta (Rijo e Vasconcelos 1984, Silva *et al.* 1992, 2002). Ao nível bioquímico foi detectado o aumento de actividade de enzimas oxidativas como a superóxido-dismutase, peroxidase (POD), lipoxigenase, enzimas da via fenilpropanoide como a PAL e as proteínas PR (quitinases e glucanases) associado à expressão de resistência do cafeeiro à ferrugem (Maxemiuc-Naccache *et al.* 1992, Rojas *et al.* 1993, Guzzo e Martins 1996, Silva *et al.* 2002, Guerra-Guimarães *et al.* 2008, Silva *et al.* 2008, Guerra-Guimarães *et al.* 2009).

Ao nível molecular foram já identificados diversos genes do cafeeiro que se expressam diferencialmente durante a resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem alaranjada e que estão envolvidos com os processos de reconhecimento, sinalização e defesa (Fernandez *et al.*, 2004; Petitot *et al.*, 2008; Ramiro *et al.*, 2009, Diniz *et al.*, 2010).

Verificou-se que em interações incompatíveis e nas fases iniciais do processo de infecção, os factores de transcrição WRKY, indutores das vias de síntese de SA e de JA, têm um aumento de expressão (Ganesh *et al.*, 2006; Ramiro, 2009; Diniz *et al.* 2010). Foi igualmente detectado um aumento de expressão do gene da *pal*, cuja actividade da enzima actua no inicio da via fenilpropanoide e está envolvida, como já foi referido, não só na síntese de SA como na formação de flavonóides e de outros compostos fenilpropanóide, alguns com actividade antimicrobiana, e que são precursores da lenhina que se deposita nas paredes celulares e impede a penetração dos agentes patogénicos (Ramiro, 2009; Diniz, *et al.* 2010). Em interações incompatíveis cafeeiro–ferrugem foi observada uma forte activação dos genes *pr*, como o *pr1b* e *pr10*, e, embora ligeira, a activação do gene *13-lox*. A activação dos genes *13-lox* e *pr1b* sugerem que as vias de sinalização do SA e do JA coexistem na interacção cafeeiro–ferrugem, embora a via do SA pareça prevalecer (Diniz *et al.* 2010).

5. Análise do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abscísico

As hormonas vegetais são difíceis de analisar porque surgem nos extractos das plantas em baixas concentrações, extractos esses ricos em substâncias que interferem também na sua detecção. Várias técnicas têm sido utilizadas, nomeadamente técnicas cromatográficas como GC-MS (Cromatografia Gás-líquido acoplada à Espectrometria de Massa) ou o HPLC-MS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa), mas também as técnicas RIA (*Radio Immunoassay*) e ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

A técnica RIA supera em especificidade mas a quantificação não é precisa devido à reactividade cruzada ou inibição dos anticorpos por outras substâncias da matriz. A técnica ELISA é utilizada para análises quantitativas, contudo a baixa pureza de alguns extractos biológicos resulta numa baixa repetibilidade do método (Durgbanshi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

A técnica de GC-MS tem sido muito utilizada na quantificação de auxinas, ABA e JA. Contudo requiere derivatização da amostra para aumentar a volatilidade dos compostos e, assim, a sensibilidade da técnica. Além disso, como exige um cuidado particular na purificação das amostras, a metodologia pode envolver muito trabalho laboratorial (Tamogami e Kodama, 1998; Wilbert *et al.*, 1998; Durgbanshi *et al.*, 2005; Segarra *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

Mais recentemente o sistema HPLC-MS tem sido utilizado por ser um método de alta sensibilidade, selectividade e exactidão (Tamogami e Kodama, 1998; Wilbert *et al.*, 1998; Gomez-Cadenas, 2002; Peck, 2003; Zhou, 2003; Durgbanshi *et al.*, 2005; Segarra *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Além disso, a técnica de electrospray (ESI) utilizada ajuda a optimizar a probabilidade de obter informação sobre a massa molecular dos compostos em análise (Durgbanshi *et al.*, 2005).

5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Existem diversos tipos de cromatografia líquida, na qual se integra a cromatografia líquido-líquido, que se baseia na distribuição das moléculas do soluto, entre duas fases líquidas imiscíveis, de acordo com as solubilidades relativas (Figura 10) (Skoog, 1997; Mendham, 2002).

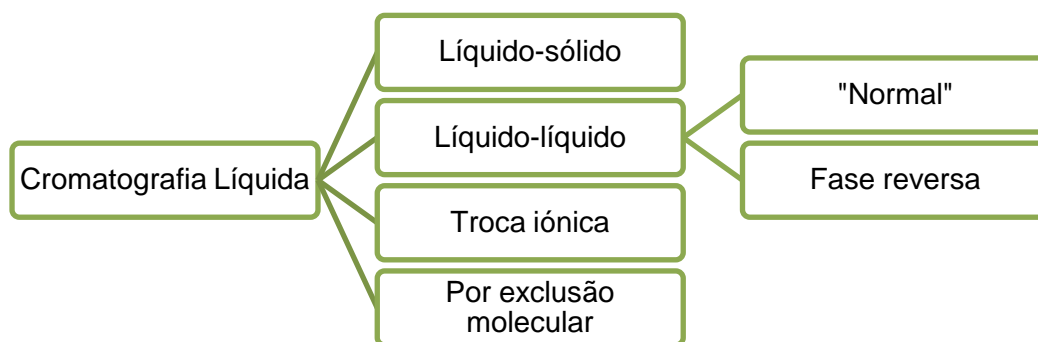


Figura 10 - Tipos de cromatografia líquida

A separação dos componentes da amostra é feita fazendo passar uma fase móvel através de uma fase estacionária. Quando a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar, a cromatografia diz-se “normal” e neste caso os solutos apolares preferem a fase móvel e são eluídos primeiro. No caso contrário, sendo a fase estacionária apolar e a fase móvel polar, a cromatografia diz-se de “fase reversa” e neste caso os solutos polares são eluídos primeiro. Esta cromatografia é muito utilizada por ser bastante eficaz, pois praticamente todas as moléculas orgânicas, não iónicas, são parcialmente hidrofóbicas logo são capazes de interagir com fases estacionárias apolares (Skoog, 1997; Mendham, 2002).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) distingue-se por utilizar a fase móvel a altas pressões. Os constituintes básicos de um sistema HPLC encontram-se esquematizados na Figura 11. Neste trabalho destacamos as características da fase móvel, da fase estacionária e o sistema de detecção.

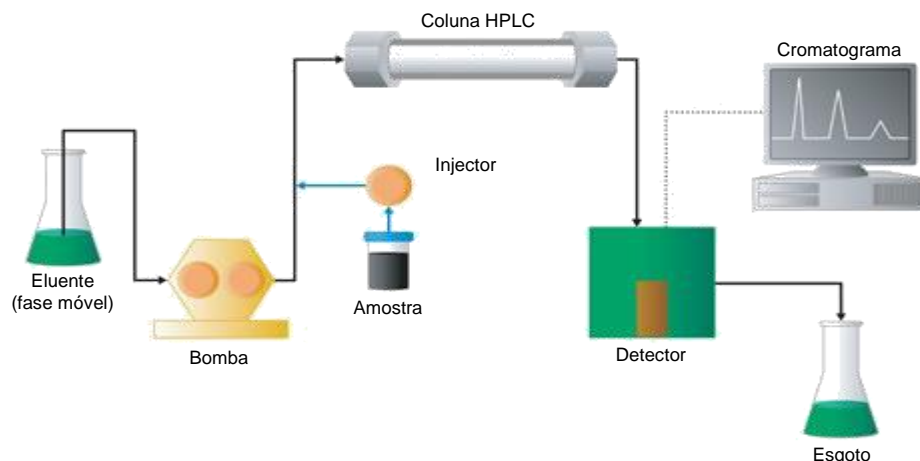


Figura 11 - Esquema representativo dos componentes de um sistema de HPLC (fonte: www.waters.com)

Um factor importante na escolha dos solventes da fase móvel é a força do eluente. Na cromatografia de “fase reversa”, o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade do solvente. Normalmente recorre-se a fases móveis polares, como a água e o metanol (Harris, 1999). Uma eluição com apenas um solvente designa-se isocrática. Ao recorrer ao uso de diversos solventes, pode criar-se um gradiente de eluição, que permite uma melhor separação de solutos. O gradiente de eluição é particularmente eficiente quando os componentes têm polaridades muito diferentes (Skoog, 1997; Harris, 1999; Mendham, 2002).

Relativamente à fase estacionária, o tipo de coluna mais utilizada actualmente é constituída por partículas porosas de sílica. Para diminuir a perda de fase estacionária para a fase móvel, o critério de escolha da fase estacionária baseia-se na menor solubilidade possível entre as duas fases. No entanto verifica-se sempre alguma perda, e por essa razão pode ligar-se quimicamente a fase estacionária ao material de suporte, designando-se por cromatografia com fase ligada. A fase ligada mais importante é do tipo C-18, em que o grupo R é um grupo octadecil. De modo a evitar a contaminação da coluna é costume colocar uma pré-coluna com a mesma fase estacionária (Harris, 1999; Mendham, 2002).

O detector utilizado depende da natureza da amostra. O mais utilizado é o de absorção no ultravioleta (UV), que mede a quantidade de luz UV/visível absorvida durante a passagem do efluente por uma célula de fluxo colocada no caminho óptico do feixe de radiação. A principal característica deste detector é a alta sensibilidade e o facto de não ser muito afectado por variações de temperatura e velocidade do fluxo do efluente. Estes detectores podem ser de feixe simples, feixe duplo, ou cobrir uma gama de comprimentos de onda (de díodos) (Harris, 1999; Mendham, 2002). Entre as diversas técnicas de detecção que podem ser utilizadas a espectrometria de massa apresenta um potencial analítico elevado.

5.2. Sistema HPLC-MS

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica de ionização e fragmentação de moléculas, sendo os iões separados em fase gasosa para obter um espectro com os fragmentos de diferentes valores massa/carga. Trata-se de uma técnica muito sensível, em que apenas alguns miligramas do analito são suficientes para a obtenção do espectro, e que revelou ter uma grande utilidade na identificação de substâncias, daí ser um bom detector acoplado à cromatografia, pois possibilita a identificação de componentes de misturas complexas e sua posterior quantificação, numa única operação (Mendham, 2002).

O estado físico em que se encontra a amostra a analisar assim como as suas características químicas são dois factores importantes a ter em conta na escolha do tipo de fonte de ionização. No caso do sistema HPLC-MS, um dos sistemas de ionização utilizados designa-se ionização por electrospray (ESI). Neste sistema o potencial eléctrico aplicado num capilar metálico (kV) promove a migração de cargas para a interface capilar/solução, resultando na formação de gotas com superfícies carregadas. A evaporação do solvente, devido à acção de um gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotas e, consequentemente, aumenta a repulsão electrostática entre as cargas. A tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor até resultar na formação de gotas menores, com posterior libertação dos iões. Forma-se, assim, um “spray” de partículas carregadas, ou seja, uma corrente electrolítica (Crotti, 2006).

No analisador de massas separam-se os iões que se formam na fonte de ionização de acordo com as razões massa/carga. O analisador de massas de quadrupolo, um dos tipos de analisadores mais comum, é composto por quatro cilindros de metal paralelos, dispostos em pares, nos quais é aplicada uma combinação de voltagens. Os iões produzidos na fonte passam entre os quatro cilindros e atingem o detector colocado na outra extremidade. Contudo se os iões se formarem mais lentamente, como no caso de iões metaestáveis, pode acontecer saírem da fonte de ionização sem serem detectados. No sistema de triplo quadrupolo (QQQ), o primeiro Q funciona como separador de iões principais, o segundo Q como célula de colisão e o terceiro Q como analisador de iões secundários (Figura 12) (Wilbert *et al.*, 1998; Mendham, 2002).

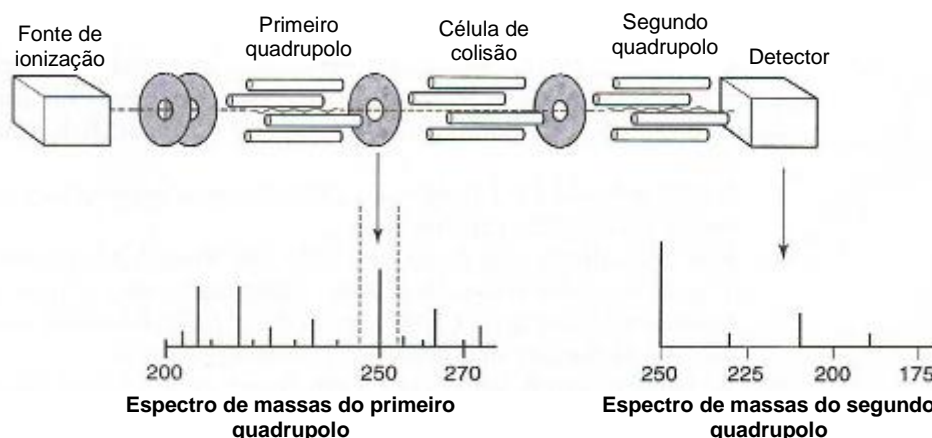


Figura 12 - Esquema representativo do sistema triplo quadrupolo (fonte: www.waters.com)

5.3. Identificação e quantificação dos compostos

A análise quantitativa requer uma relação linear entre a magnitude do sinal e a concentração de um determinado soluto da amostra. A intensidade do sinal é dada pela área do pico. A partir de soluções padrão com concentrações conhecidas é possível preparar curvas de calibração, que permitem identificar, através do tempo de retenção e/ou das massas, e quantificar os compostos isoladamente (Mendham, 2002).

O espectrómetro de massa permite trabalhar em diferentes modos, como o modo SCAN (varrimento), o *Daughter Scan*, o SIR (*Single Ion Recording*) e o MRM (*Multiple-Reaction Monitoring*). O modo SCAN fornece o TIC (*Total Ionic Current*) sendo utilizado para testar e otimizar as condições de análise apropriadas para os compostos que se pretendem analisar, enquanto o *Daughter Scan* é usado para estudar a fragmentação e iões daí resultantes. O modo MRM é empregue para a análise quantitativa pois através das condições de ionização estudadas anteriormente é possível seleccionar o par ião precursor/ião produto pretendido (Wilbert, 1997; Tamogami e Kodama, 1998; Segarra *et al.*, 2006).

5.4. Validação do método de análise

A validação do método é o processo através do qual se demonstra se um método analítico é adequado para os objectivos pretendidos, recorrendo à realização de diversos ensaios laboratoriais, permitindo assim assegurar que um ensaio conduz a resultados credíveis (Ribeiro *et al.*, 2008).

Para a validação de um método é necessário estabelecer os parâmetros analíticos de acordo com os objectivos pretendidos. Destacamos os parâmetros estudados neste trabalho:

- Especificidade:

A especificidade é a capacidade de um método analítico para identificar inequivocamente um determinado analito na presença de outros compostos presentes na matriz.

- Linearidade:

A linearidade é expressa pelo intervalo de concentrações onde os resultados são directamente proporcionais, ou directamente expressos através de uma expressão matemática, à concentração do analito na amostra (Ribani *et al.*, 2004).

Para a avaliação da linearidade da curva de calibração do método pode utilizar-se o coeficiente de correlação (r^2) obtido através do método dos mínimos quadrados. Quando r^2 é superior a 0,99 considera-se que o método de análise é linear. Outro método, mais robusto, para confirmar a linearidade de um conjunto de resultados é o teste de Mandel, ou teste de homogeneidade de variâncias. Este consiste na comparação de um valor teste denominado PG, com um valor F_{test} crítico para um grau de confiança de 99%, que se encontra tabelado. Considera-se que o método é linear quando o valor de PG é inferior ao valor F_{test} (Mendham, 2002; Ribeiro, 2008).

- Precisão:

A precisão é o grau de concordância entre os resultados individuais quando o processo é aplicado repetidamente a alíquotas múltiplas de uma amostra homogénea. Normalmente a precisão é expressa através do desvio padrão ou do coeficiente de variação (desvio padrão relativo).

Na precisão devem ser considerados diversos parâmetros como:

- repetibilidade do equipamento: traduz a precisão do equipamento e neste caso é avaliada injectando a mesma solução um certo número de vezes;
- repetibilidade do método: consiste em analisar diferentes alíquotas de uma amostra homogénea, cada uma delas preparada de maneira independente;
- precisão intermédia: expressa a precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, mas sendo a determinação efectuada em diferentes dias (Mendham, 2002; Pizzutti, 2006).

- Limites analíticos:

O limite de detecção (LD) é definido como o teor mínimo a partir do qual é possível detectar a presença do analito, ou seja, corresponde à quantidade mínima de analito que é possível distinguir do branco, e pode ser determinado através da expressão,

$$LD = 3 \times \frac{S_y}{b}$$

em que S_y/x é o erro-padrão e o b é o declive da curva de calibração.

Pode ainda ser determinado a partir da determinação do ruído, sendo o limite de detecção dado pela concentração que origina um sinal que é três vezes o ruído (Lourenço, 1997).

O limite de quantificação (LQ) corresponde à mais baixa concentração a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma determinada exactidão e precisão, e pode ser determinado pela expressão,

$$LQ = 10 \times \frac{S_y}{b}$$

em que S_y/x é o erro-padrão e o b é o declive da curva de calibração.

Pode ser determinado a partir do ruído, sendo o limite de quantificação a concentração que corresponde dez vezes o ruído (Lourenço, 1997).

- Exactidão:

A exactidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceite, ou seja, descreve a capacidade de um método analítico obter o resultado “verdadeiro” ou correcto. Expressa-se em termos de um erro relativo associado à média de um conjunto de resultados experimentais (x_p) quando comparada com o verdadeiro valor (x_{ref}):

$$Erro\ relativo = \frac{x_p - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100\%$$

Um modo de avaliar a exactidão de um método é por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas adicionadas à matriz da amostra (Lourenço, 1997).

6. Objectivos

O presente trabalho teve como objectivo principal compreender o papel do SA, do JA e do ABA nas respostas de defesa de *C. arabica* induzidas após a infecção pela ferrugem alaranjada (*H. vastatrix*). Neste estudo foi utilizada a variedade S4 Agaro inoculada com a raça II de *H. vastatrix* de modo a obter uma interacção incompatível.

Inicialmente foi necessário implementar um método de análise através da escolha e optimização do método de extracção em folhas de cafeeiro sãs, todos baseados em extracções líquido-líquido, e da validação do método de análise por HPLC-DAD-MS/MS. Posteriormente foi então estudar-se a interacção incompatível cafeeiro-ferrugem através da quantificação dos compostos em estudo em folhas de cafeeiro inoculadas, e da monitorização do processo de infecção através de estudos citológicos, tendo sido identificadas as diferentes fases de diferenciação pré- e pós-penetração no interior dos tecidos foliares.

II. Parte experimental

1. Material biológico

1.1. Cafeeiro

Os cafeeiros utilizados pertencem a *Coffea arabica* variedade S4 Agaro, proveniente de uma colecção de cafeeiros do CIFC. Este cafeeiro é originário da Etiópia, pertence ao grupo fisiológico J e contém os genes de resistência $S_H 4,5$.

Os cafeeiros cresceram em estufa, em vasos com terra vegetal, turfa e areia, na proporção de 4:1:1 (v/v/v).

1.2. Ferrugem alaranjada

Os cafeeiros foram inoculados com uredósporos frescos do isolado 1065 de *Hemileia vastatrix*, originário da Índia. Este isolado caracteriza-se por pertencer à raça fisiológica II e possui o gene de virulência v_5 .

1.3. Inoculação

Pares de folhas jovens de *C. arabica* S4 Agaro, próximas do tamanho definitivo, foram inoculadas na página inferior com uredósporos frescos de *H. vastatrix* raça II, segundo a técnica descrita por Branquinho D' Oliveira (1954-57), estabelecendo uma interacção incompatível (resistência). Os uredósporos foram colocados através da ajuda de um escalpelo e espalhados com um pincel de pêlo de camelo. Recorrendo a um atomizador, pulverizou-se a área inoculada com água destilada e em seguida pulverizou-se todo o cafeeiro, para fornecer as condições de humidade necessárias à germinação do fungo. Os cafeeiros foram mantidos em câmara húmida, no escuro, durante 24 horas.

A colheita das folhas inoculadas foi realizada no momento às 0h, 12h, 15h, 18h, 20h, 24h, 30h, 36h 42h, 48h, 72h e 96 h após a inoculação. Como controlo foram utilizadas folhas sãs, mantidas nas mesmas condições que as inoculadas.

2. Preparação dos tecidos para observação ao microscópio óptico

2.1. Avaliação da germinação dos uredósporos e formação de apressórios

A determinação das percentagens de uredósporos germinados e de apressórios formados de *H. vastatrix* foi realizada de acordo com a técnica descrita por Silva *et al.* (1985). Secções de fragmentos de folhas, com cerca de 2cm², foram cortados 24h após a inoculação. Para se obter um molde da superfície foliar, os fragmentos da folha foram pincelados com uma camada de verniz transparente que, depois de seco, foi destacado com a ajuda de uma pinça e corado com azul de algodão. Desta forma as estruturas do fungo coram de azul. Posteriormente foram montados numa lâmina, com uma mistura clara de azul de algodão em lactofenol, e observados ao microscópio de campo claro. A determinação da percentagem de uredósporos germinados e de apressórios formados foi baseada na contagem de um mínimo de 6 conjuntos de 100 uredósporos por experiência.

2.2. Avaliação do processo de colonização

Para avaliar o processo de colonização do fungo seccionaram-se fragmentos de folhas infectadas, em diferentes tempos após a inoculação. Recorrendo a um micrótomato de congelação foram realizados cortes, com 20 a 25 µm, que foram posteriormente corados com uma mistura clara de azul de algodão em lactofenol, montados e observados ao microscópio de campo claro (Rijo e Rodrigues Jr. 1978). Acompanhou-se o evoluir da infecção no interior dos tecidos foliares até às 96 h.a.i..

Todas as observações foram efectuadas em microscópico de campo claro (Leica, modelo DM 2500).

3. Análise do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abcísico

3.1. Equipamento e reagentes

3.1.1. Equipamento

- HPLC-DAD (1): Thermo Finning, Surveyor, com pré-coluna 4 mm Lichrocart® e coluna RP-18 (5 µm) 250 x 4 mm Lichrocart®
- HPLC (2): Beckman System Gold, 126 Solvent Module e 168 Detector, com coluna RP-18 (10 µm) 250 x 4 mm Lichrosphere®
- HPLC-DAD-MS/MS: Alliance, Waters 2695 Separation Module, com bomba quaternária e detector de fotodíodos (PAD-Photodiode Array Detector) Waters 2996, com

coluna Synergi 2,5 mm Max - RP (Phenomenex), acoplado com o sistema de espectrómetro de massa Micromass Quattro Micro do tipo triplo quadrupolo e com fonte de ESI

- Espectrofotómetro: Beckman DU-70 Spectrophotometer

3.1.2. Reagentes

Ácido fórmico 98%, ácido clorídrico 37%, ciclohexano 99,5%, metanol (MeOH) 99,8%, acetato de sódio 99,5% e ácido tricloroacético (TCA) 98% da Merck. Acetonitrilo 99,9% da Fisher Scientific. Acetato de etilo 99,8% da Lab-Scan Analytical Sciences. Ácido acético glacial 99,7%, hidróxido de sódio (NaOH) 99% e éter dietílico 99,7% da Panreac. SA≥99,0%, ABA 98,5% e JA 99% da Sigma-Aldrich.

3.2. Preparação de soluções

3.2.1. Preparação de soluções padrão

Para preparar uma solução padrão com 400 ppm pesou-se 10,0 mg de SA e adicionou-se MeOH para o dissolver. De seguida colocou-se a solução num balão volumétrico de 25 mL e perfez-se o restante volume com MeOH. A partir desta solução prepararam-se outras soluções padrão numa gama de concentrações entre 0,0313 e 200 ppm. Procedeu-se de igual modo na preparação das soluções padrão de JA e ABA.

3.2.2. Preparação do reagente de Carrez

Solução I: dissolveu-se 10,95 g de acetato de zinco, adicionou-se 3 mL de ácido acético glacial e perfez-se o volume de 50 mL com água destilada.

Solução II : dissolveu-se 5,3 g de hexacianoferrato II de potássio em 50 mL de água destilada.

O reagente de Carrez foi preparado com partes iguais de cada uma das soluções.

3.3. Preparação das amostras a partir de tecido fresco

Cada amostra foi preparada a partir de 3 g de peso fresco, o que corresponde a cerca de 3 pares de folhas. Às folhas colhidas foi-lhes retirada a nervura central com o auxílio de uma lâmina e foram congeladas imediatamente em azoto líquido. De seguida foram colocadas num almofariz de porcelana e maceradas até obtenção de um pó.

3.3.1. Método Ky

A amostra moída foi colocada num Erlenmeyer e foi extraída com 30 mL de MeOH a 70%, sob agitação a 4°C, durante a noite. Após este período adicionou-se 1 mL do reagente de Carrez e deixou-se em repouso durante 15 minutos. A amostra foi filtrada, primeiro através de uma gaze e de seguida por um filtro Whatman nº1 (Ky *et al.*, 1997). O filtrado foi dividido, uma metade foi guardado a 4°C e a outra metade foi concentrada por evaporação rotativa sem deixar levar à secura.

3.3.2. Método Correia

À amostra moída adicionou-se 10 mL de MeOH a 40% e colocou-se a agitar no agitador orbital a 125 rpm, a 4°C durante 30 minutos. De seguida procedeu-se à centrifugação a 10000 g durante 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido para um balão aferido de 50 mL. Este procedimento foi repetido mais três vezes com 10 mL de MeOH 40%. Aos sobrenadantes foi adicionado 1 mL do reagente de Carrez e completou-se o volume do balão com MeOH 40%. Os extractos repousaram durante 15 minutos e em seguida foram filtrados, primeiro por uma gaze e de seguida por um filtro Whatman nº1 (Correia, 1990). O filtrado foi dividido, uma metade foi guardado a 4°C e a outra metade foi concentrada em SpeedVac sem deixar levar à secura.

3.3.3. Método Durgbanshi

A amostra moída foi extraída com 6 mL de MeOH 85% e agitada no vortex durante 1 minuto. De seguida a mistura foi colocada num banho de ultrasons durante 5 minutos e posteriormente o extracto foi centrifugado a 10 000 g durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado (Whatman nº1) e concentrado por evaporação rotativa. Ao resíduo adicionou-se 1 mL de água destilada e ajustou-se o pH a 3 com ácido acético. O extracto foi fraccionado duas vezes com a da adição de 2,5 mL de éter dietílico, as fases orgânicas foram recolhidas e concentradas por evaporação rotativa. O resíduo foi recuperado em 1 mL de MeOH 10% (Durgbanshi *et al.*, 2005).

3.3.4. Método López-Carbonell

A amostra moída foi extraída com 8 mL de uma mistura de acetona/água/ácido acético (80:19:1) e agitada no vortex durante 30 segundos. De seguida o extracto foi centrifugado a 15 000 g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado foi extraído de novo com 8 mL de acetona/água/ácido acético (80:19:1). Os sobrenadantes foram juntos, filtrados (Whatman nº1) e foram concentrados por evaporação rotativa. O resíduo foi recuperado em 1 mL de MeOH 10% (López-Carbonell *et al.*, 2009).

3.3.5. Método Wilbert

A amostra moída foi extraída com 8 mL de MeOH acidificado (0,1% de ácido clorídrico) e agitada no vortex durante 30 segundos. Posteriormente foi centrifugada a 15 000 *g* durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado foi extraído mais duas vezes com 8 mL de MeOH acidificado. Os sobrenadantes foram juntos, filtrados (Whatman nº1) e concentrados por evaporação rotativa sem deixar levar à secura. As amostras foram recuperadas em 1 mL de MeOH 10% e posteriormente foram centrifugadas para clarificar a amostra (Wilbert *et al.*, 1998).

3.3.6. Método Verbene

À amostra moída foi adicionado 6 mL de MeOH a 85% e procedeu-se a agitação no vortex durante 1 minuto. De seguida a mistura foi colocada num banho de ultra-sons durante 5 minutos e posteriormente o extracto foi centrifugado a 10 000 *g* durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado foi extraído mais duas vezes com 6 mL de MeOH 100%. Os sobrenadantes foram filtrados (Whatman nº1) e de seguida concentrados por evaporação rotativa, sem deixar levar à secura (recolheu-se aproximadamente 2 mL). O concentrado foi filtrado (Whatman nº1) e adicionou-se 500 µL de TCA a 5%. Depois de agitada, a mistura foi fraccionada duas vezes com igual volume de solução de ciclohexano:acetato de etilo (1:1). As fases orgânicas foram recolhidas para um balão e concentradas por evaporação rotativa. O resíduo foi recuperado em 1 mL de MeOH 10% (Verbene *et al.*, 2002).

3.3.6.1. Optimização das condições de extracção

Para optimizar as condições de extracção preparou-se o seguinte conjunto de amostras de solução padrão e avaliou-se a taxa de recuperação:

- Solução “SA”: medir 250 µL da solução padrão de SA a 400 ppm e perfazer o volume de 10 mL com MeOH;
- Solução “SA 1 mL”: utilizar uma amostra “SA” e sujeitá-la ao método Verbene até à primeira evaporação, sem deixar levar à secura. Recuperar com MeOH e completar o volume de 10 mL;
- Solução “SA sec”: utilizar uma amostra “SA” e sujeitá-la ao método Verbene até à primeira evaporação, deixando levar à secura. Recuperar com MeOH e completar o volume de 10 mL.
- Solução “SA+NaOH”: medir 250 µL da solução padrão de SA a 400 ppm, adicionar 125 µL de NaOH para um balão de 10 mL e perfazer o volume de 10 mL com MeOH;

- Solução “SA+NaOH 1 mL”: utilizar uma amostra “SA+NaOH” e sujeitá-la ao método Verbene até à primeira evaporação, sem deixar levar à secura. Recuperar com MeOH e completar o volume de 10 mL;

- Solução “SA+NaOH sec”: utilizar uma amostra “SA+NaOH” e sujeitá-la ao método Verbene até à primeira evaporação, deixando levar à secura. Recuperar com MeOH e completar o volume de 10 mL;

Procedeu-se ao traçado dos espectros de absorção de todas estas soluções no espectrofotómetro.

Seguindo as sugestões fornecidas por Verbene *et al.* (2002), foi também preparado o seguinte conjunto de amostras partindo de solução padrão de SA de 500 µL a 200 ppm:

- Solução “SA 1 ev”: método Verbene normal até à primeira evaporação rotativa. O resíduo é recuperado e o volume é acertado a 1 mL com recurso a MeOH 10%.

- Solução “SA 2 ev”: método Verbene normal até à segunda evaporação rotativa. O resíduo é recuperado com 1 mL de MeOH 10%.

- Solução “SA+NaOH 1 ev”: método Verbene até à primeira evaporação rotativa, com adição de 125 µL de NaOH 0,2 M ao sobrenadante antes da concentração. O resíduo é recuperado e o volume é acertado a 1 mL com recurso a MeOH 10%.

- Solução “SA+NaOH+CH₃COONa 2 ev”: método Verbene até à segunda evaporação rotativa, com adição de 125 µL de NaOH 0,2 M aos sobrenadantes antes da primeira concentração, e adição de 750µL de acetato de sódio aos sobrenadantes antes da segunda concentração. O resíduo é recuperado com 1 mL de MeOH 10%.

Procedeu-se à análise destas soluções no sistema de HPLC (2).

3.4. Análise cromatográfica

3.4.1. Condições de análise por HPLC-DAD (1)

As amostras foram analisadas recorrendo ao uso de dois eluentes:

- Eluente A: Solução de ácido fosfórico *p.a.* (0,1%);
- Eluente B: Solução com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico *p.a.*, 40% (v/v) de acetonitrilo HPLC gradient grade.

O volume de injeção utilizado é 20 µL e o fluxo da fase móvel é de 0,70 mL/min, sendo o gradiente de solventes o apresentado na tabela seguinte (Quadro 2):

Quadro 2 - Programa de eluição do HPLC-DAD (1)

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
10	100	0
15	80	20
25	80	20
70	30	70
75	30	70
85	0	100
100	0	100
101	100	0
110	100	0

No detector de fotodíodos utilizou-se um varrimento de 192 a 798 nm e uma resolução de 5 nm. Neste estudo foram seleccionados 3 comprimentos de onda individuais, 306 nm, 280 nm e 264 nm.

3.4.2. Condições de análise por HPLC (2)

As amostras foram analisadas recorrendo ao uso de MeOH 50%, em sistema isocrático, durante 10 min. O volume de injeção utilizado foi 100 µL e o fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. No detector de fotodíodos utilizou-se um varrimento de 210 a 570 nm e uma resolução de 1,2 nm.

Como o HPLC (2) foi utilizado somente para análise de soluções padrão de SA, não foi necessário utilizar um sistema de gradiente de eluição.

3.4.3. Condições de análise por HPLC-DAD-MS/MS

As amostras foram analisadas recorrendo ao uso de dois eluentes:

- Eluente A: Solução de ácido fórmico *p.a.* (0,5%);
- Eluente B: Acetonitrilo HPLC gradiente grade

O volume de injeção foi 5 µL e o fluxo é de 0,20 mL/min, sendo o gradiente de solventes o apresentado na tabela seguinte (Quadro 3):

Quadro 3 - Programa de eluição do HPLC-DAD-MS/MS

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	95	5
30	60	40
45	10	90
47	95	5
60	95	5

No detector de fotodíodos utilizou-se um varrimento de 210 a 600 nm e uma resolução de 1,2 nm. A fonte de iões encontra-se a 120°C e o fluxo de gases do cone é de 50 L/Hr.

3.4.4. Optimização do método de detecção do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abcísico no HPLC-MS/MS.

Foi realizado o seguinte conjunto de experiências de modo a otimizar as condições de análise por HPLC-MS/MS:

- 1) Injecção directa das soluções de padrões no espectrómetro de massa
 - 1.1) Optimizar as condições de análise para detectar os iões moleculares do SA, ABA e JA (modo SCAN).
 - 1.2) Estudar a fragmentação do ião molecular utilizando diferentes valores de energia de colisão (modo *Daughter Scan*).
- 2) Optimização do método de separação por HPLC.
- 3) Optimização do método de análise MRM.

3.4.5. Validação do método de análise por cromatografia (HPLC-DAD-MS/MS)

- Especificidade: analisaram-se as soluções padrão de SA, JA e ABA, a 10 ppm, pelo modo MRM.
- Linearidade: analisou-se 4 réplicas do conjunto das soluções padrão com as seguintes concentrações: 0,0313 ppm, 0,0625 ppm, 0,125 ppm, 0,25 ppm, 0,50 ppm, 1,0 ppm, 2,5 ppm, 5,0 ppm e 10,0 ppm e estudou-se a resposta do detector em função da concentração.
- Precisão
 - repetibilidade do equipamento: foi testada recorrendo à análise de uma solução de mistura de padrões na concentração de 1,0 ppm (n=6). O resultado é expresso através do Desvio Padrão Relativo.
 - repetibilidade do método: foi testada analisando 6 soluções independentes da mistura de padrões em 3 pontos da gama de trabalho de aplicação do método (0,0625 ppm, 1,0 ppm e 10,0 ppm). O resultado é expresso através do Desvio Padrão Relativo.
 - precisão intermédia: uma solução padrão com a concentração 0,125 ppm foi analisada (n=12) para avaliar a estabilidade do detector durante os vários dias de trabalho.
- Limites analíticos (LD e LQ): foram estudados com base nos dados correspondentes às curvas de calibração e à razão sinal/ruído de 4 réplicas do conjunto das soluções padrão, as mesmas utilizadas na determinação da linearidade do método.

- Exactidão: foi avaliada com a análise de três extractos de folhas obtidos através do método Verbene *et al.* (2002), com a sobrecarga de 100 ppm das soluções padrão de SA, JA e ABA. É expressa em taxa de recuperação.

3.5. Análise por espectrofotometria de UV

As amostras preparadas a partir da solução padrão de SA descritas anteriormente foram analisadas na zona do UV, realizando um varrimento de 200 a 370 nm, a uma velocidade de 300 nm/min.

3.6. Tratamento dos resultados

Nos resultados de microscopia, os dados relativos às fases pré- e pós-penetração dos fungos foram submetidos ao Teste *t* de Student e a análises de variância. Para a comparação das médias usou-se o teste da mínima diferença significativa (MDS) de Fisher. Para os valores expressos em percentagem foi usada a transformação $\arcsen\sqrt{\%}$.

Para análise dos resultados relativamente à quantificação de ABA, SA e JA em extractos de folhas considerou-se o “Controlo” como sendo o valor médio dos valores dos compostos quantificados nas amostras controlo (folhas de *C. arabica* sãs) calculado para cada um dos ensaios (de forma independente), e assumiu-se que esse valor corresponderia a 100% da concentração de cada um dos compostos estudados nas amostras. Os valores (em %) dos compostos quantificados nas amostras da interacção incompatível foram calculados em relação ao valor médio obtido para o “Controlo” para cada um dos ensaios.

III. Resultados e Discussão

O trabalho realizado compreendeu diferentes fases que consistiram na escolha do método de extracção mais adequado ao estudo dos extractos de folhas e sua optimização, optimização e validação do método de análise por HPLC-DAD-MS/MS, e finalmente a análise de amostras colhidas em diferentes fases no processo de infecção.

Foram utilizados diferentes equipamentos de HPLC, nomeadamente o sistema (1) usado com o objectivo de comparar os resultados obtidos na análise das amostras preparadas. O sistema HPLC-DAD-MS/MS foi utilizado por ser um método de análise mais sensível e específico, além de que um dos compostos que se pretendia estudar não absorve UV. Para avaliação e optimização das condições de extracção utilizou-se o sistema HPLC (2) e o espectrofotómetro. No início do dia de trabalho foi sempre analisado uma amostra constituída pelo solvente para avaliar as condições em que se encontrava o sistema cromatográfico. O aparecimento de picos do solvente no cromatograma poderia significar uma eventual contaminação da coluna cromatográfica.

O gradiente de eluição, quando usado, permitiu uma separação adequada dos compostos que se pretendia analisar pois a natureza destes é apolar. Assim sendo, ao eluir primeiro uma percentagem elevada de solvente aquoso (polar) vai limpar a amostra de compostos que não interessam para a análise enquanto os ácidos que se pretendem estudar ficam retidos na coluna. Gradualmente vai proceder-se ao aumento da percentagem de solvente menos polar que vai eluindo selectivamente os compostos, resultando na separação pretendida. Depois de os compostos terem eluído, a percentagem de solvente polar volta a aumentar de modo a colocar o equipamento nas condições de análise iniciais.

1. Implementação do método de análise

1.1. Comparação de diferentes métodos de extracção por HPLC-DAD (1)

Para proceder à identificação do SA e do ABA nas amostras analisou-se uma solução padrão destes compostos, a 10 ppm cada (Figura 13 e 14). Verificou-se que o SA tem um tempo de retenção de aproximadamente 46 minutos e o ABA aproximadamente 64 minutos, nas condições utilizadas no ensaio. Relativamente ao JA, este não é detectado utilizando este modo de detecção.

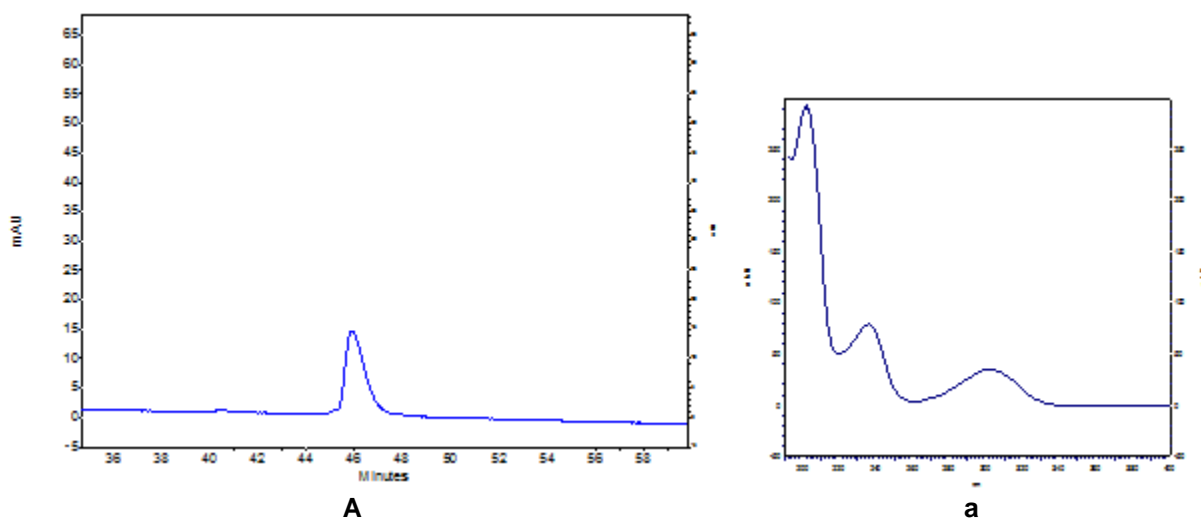


Figura 13 - A: Perfil cromatográfico da solução padrão SA a 10 ppm, a: espectro de absorção correspondente

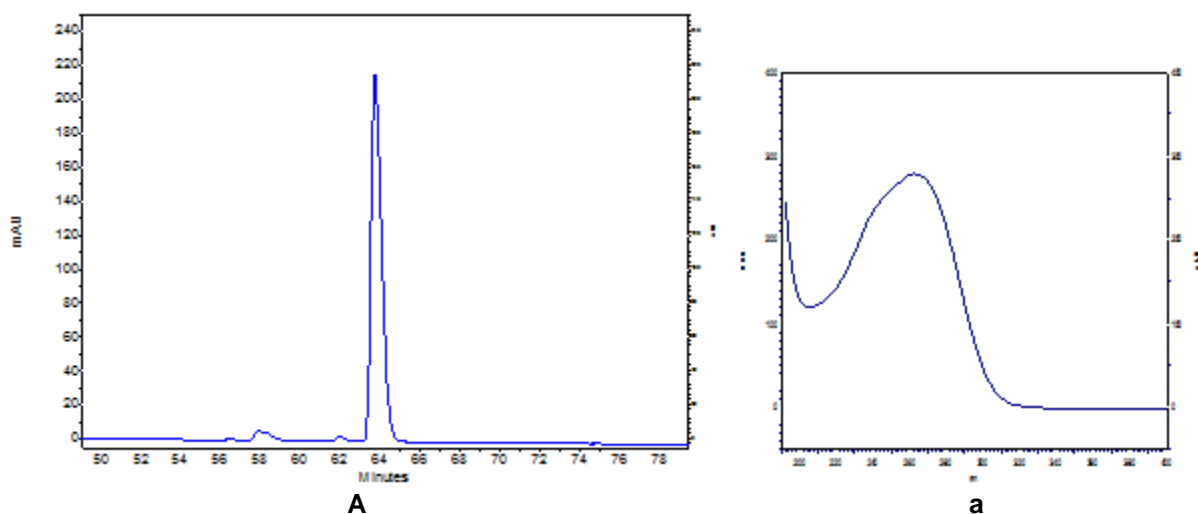


Figura 14 - A: Perfil cromatográfico da solução padrão ABA a 10 ppm, a: espectro de absorção correspondente

Para a optimização das condições de extracção foram comparados os cromatogramas obtidos na análise das amostras obtidas pelo método de extracção Ky, método de extracção Correia e as respectivas soluções padrão. Foi possível concluir que se o SA e o ABA estivessem presentes, estariam abaixo do limite de detecção do método pois não foi possível detectá-los no cromatograma. Assim sendo, procedeu-se à sobrecarga das amostras Ky e Correia, com SA a 10 ppm e ABA a 10 ppm, na proporção amostra:padrão de 1:1.

Ao realizar a sobrecarga das amostras seria de esperar que os picos que poderiam pertencer ao SA e ao ABA permanecessem com a mesma altura ou aumentassem o seu tamanho, e os restantes picos diminuíssem, devido ao efeito de diluição. No entanto, relativamente ao SA, o que se verificou foi o aparecimento de um pico que anteriormente não estava presente, como é indicado pela seta na Figura 15. Relativamente ao ABA, todos os picos presentes na amostra diminuiram o seu tamanho devido ao efeito de diluição.

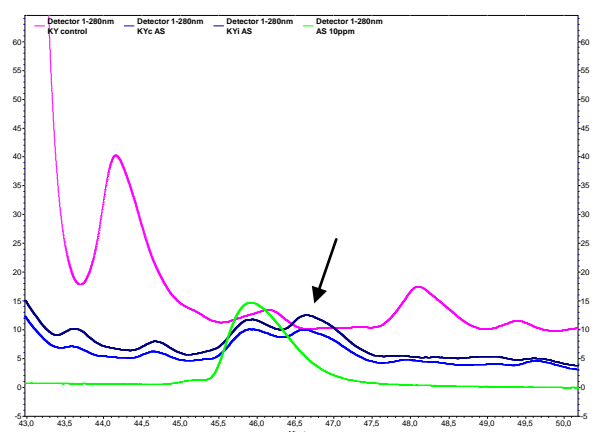


Figura 15 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de SA (verde), da amostra Ky controlo (rosa) e das amostras Ky controlo com sobrecarga de SA (azul) e Ky inoculado com sobrecarga de SA (azul-escuro)

Assim sendo, conclui-se que o método Ky e o método Correia não seriam os mais adequados para o estudo do SA e do ABA.

Posteriormente comparou-se as amostras obtidas pelo método de extracção Durgbanshi e pelo método de extracção Verbene com soluções padrão de SA e ABA. Constatou-se a presença de um pico coincidente com o do SA nas amostras obtidas pelos dois métodos nos tempos de retenção 47,250 min, amostra Durgbanshi, e 47,297 min, amostra Verbene (Figura 16A). Foram comparados os espectros de absorção e conclui-se que não são coincidentes, o que indica que o SA poderá estar a co-eluir com outros compostos presentes nas amostras, ou poderá estar em concentrações muito baixas ou poderá mesmo não estar presente (Figura 16a).

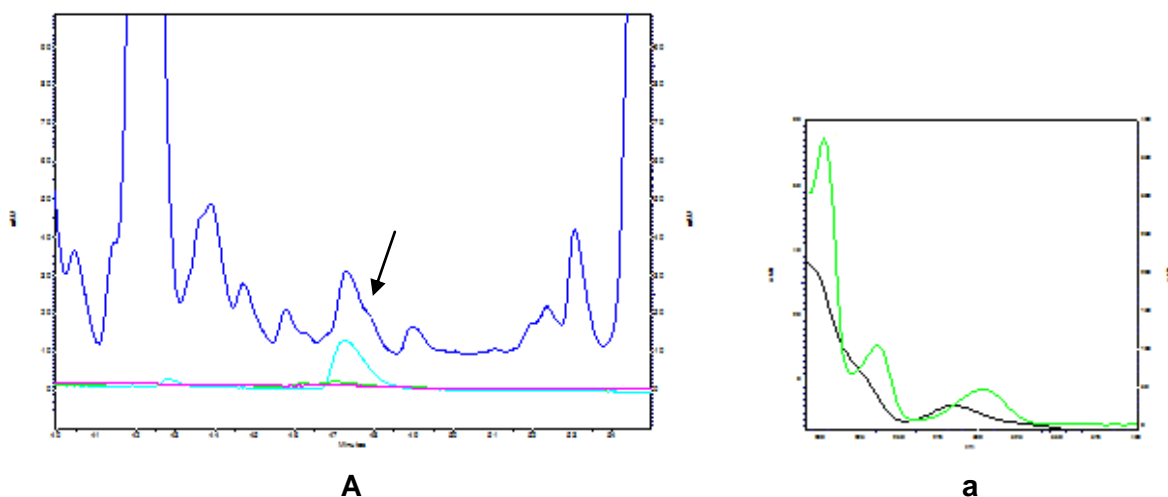


Figura 16 – A: Comparação dos perfis cromatográficos das soluções padrão de SA e ABA (10 ppm (azul-claro), 1 ppm (verde) e 0,5 ppm (rosa)) e da amostra Verbene (azul) para a detecção de SA; **a:** espectro de absorção da amostra (preto) e do SA (verde).

Ao avaliar a presença de ABA verificou-se a existência de um “ombro” no pico perto do tempo de retenção 63.738 min, na amostra Durgbanshi, e 63.023 min, na amostra Verbene, parcialmente coincidente com o padrão de ABA (1 ppm) (Figura 17A). No entanto, pela análise dos espectros de absorção é possível concluir que este pico não pertence ao ABA (Figura 17a).

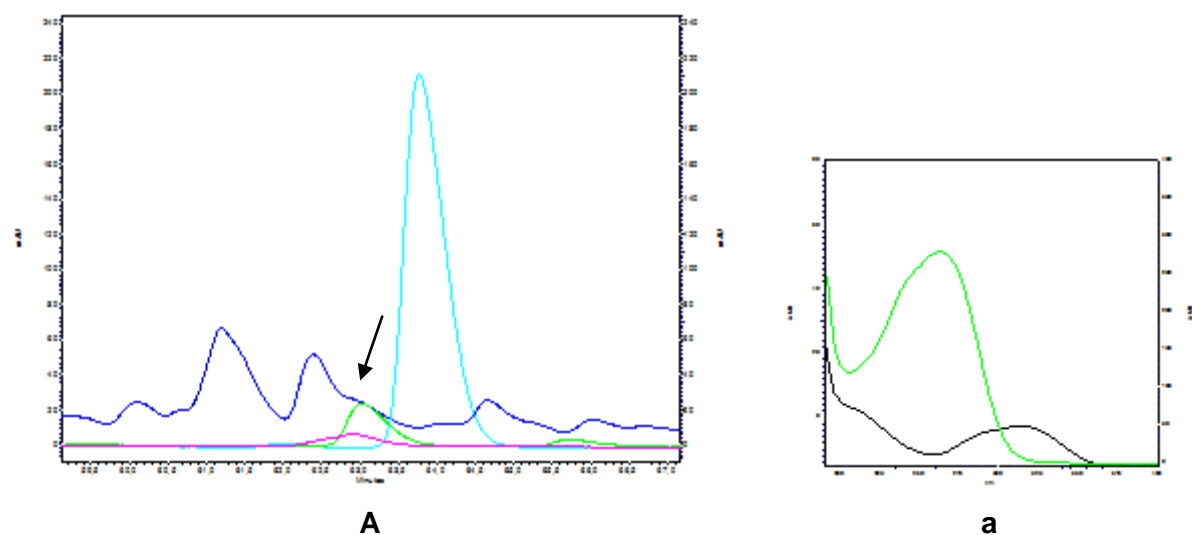


Figura 17 – A: Comparação dos perfis cromatográficos das soluções padrão de SA e ABA (10 ppm (azul-claro), 1 ppm (verde) e 0,5 ppm (rosa)) e da amostra Verbene (azul) para a detecção de ABA; **a:** espectro de absorção da amostra (preto) e do SA (verde).

Após a análise destes resultados conclui-se que seria necessário fazer uma sobrecarga das respectivas amostras com o padrão SA a 10 ppm e ABA a 1 ppm, na proporção amostra:padrão de 1:1.

Após a sobrecarga de SA na amostra Durgbanshi verifica-se que todos os picos diminuem a sua intensidade para metade devido à diluição, e surgiu um pico próximo do tempo de retenção esperado, levando a concluir que inicialmente não existiria SA na amostra ou estava presente em teores inferiores ao limite de detecção (Figura 18A). Quando se procedeu à sobrecarga de ABA na amostra Durgbanshi, verificou-se o alargamento do “ombro”, o que significa que existe um composto diferente a eluir próximo do tempo de retenção do ABA (Figura 18B). Desta forma conclui-se que este método de extracção não seria o mais adequado.

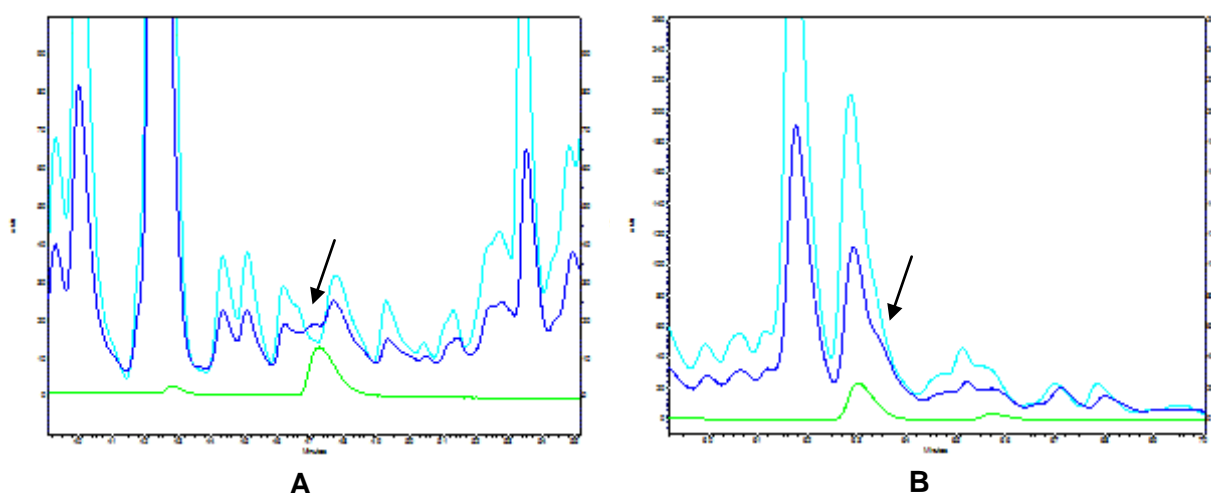


Figura 18 - A: Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de SA a 10 ppm (verde), da amostra Durgbanshi sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Durgbanshi com sobrecarga de SA (azul); B: Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de ABA a 1 ppm (verde), da amostra Durgbanshi sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Durgbanshi com sobrecarga de ABA (azul)

Após a sobrecarga de SA na amostra Verbene, observa-se que a maioria dos picos diminui a sua intensidade devido à diluição com o padrão, verificando-se que o “ombro” existente fica aproximadamente da mesma altura, levando a concluir que possivelmente o SA estaria presente na amostra (Figura 19A). O mesmo se verifica quando se procede à sobrecarga de ABA (Figura 19B).

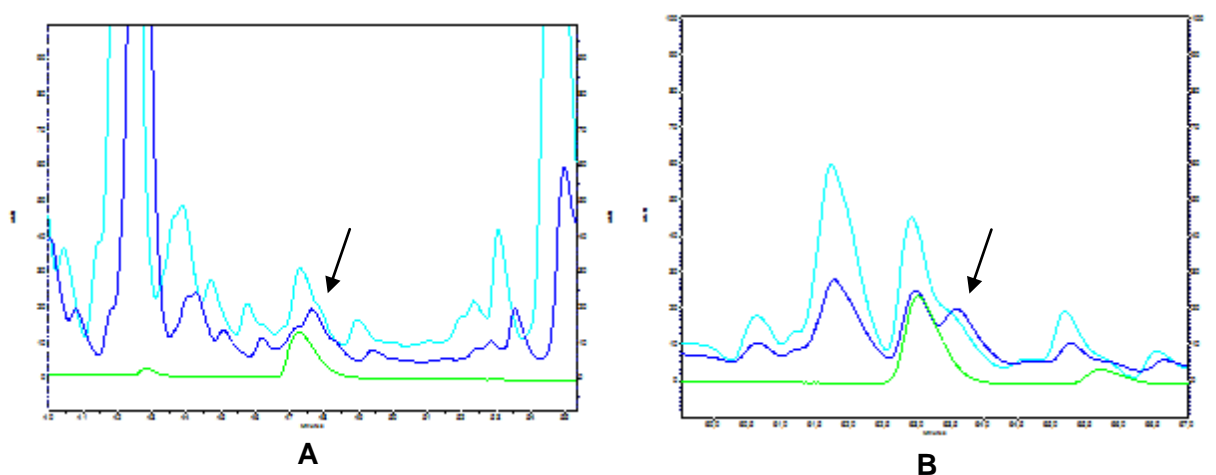


Figura 19 - A: Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de SA a 10 ppm (verde), da amostra Verbene sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Verbene com sobrecarga de SA (azul); **B:** Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de ABA a 1 ppm (verde), da amostra Verbene sem sobrecarga (azul-claro) e da amostra Verbene com sobrecarga de ABA (azul.)

Como é possível concluir pelos resultados obtidos, com o sistema HPLC-DAD (1) é difícil detectar a presença do SA e do ABA pois não só não se consegue fazer uma separação eficaz e adequada dos componentes da amostra, como a informação fornecida pelos espectros de absorção é insuficiente para tirar conclusões. Além disso o modo de detecção usado não permite a detecção do JA. Desta forma, utilizou-se o equipamento HPLC-DAD-MS/MS por permitir a identificação adequada de todos os compostos que se pretendem estudar e por permitir uma maior especificidade na análise destas amostras.

1.2. Optimização do método de detecção do ácido salicílico, ácido jasmónico e ácido abcísico no HPLC-MS/MS

Procedeu-se à análise das soluções de padrões por infusão directa no espectrómetro de massa e optimizou-se as condições de potencial de cone, potencial de capilar e energias de colisão. No Quadro 4 apresentam-se as condições optimizadas para cada um dos padrões. Relativamente ao potencial de capilar, o valor utilizado para todos os padrões foi de 2,50 kV.

Quadro 4 - Ião precursor utilizado na infusão directa no espectrómetro de massa e condições de potencial de cone e de energia de colisão

	Ião precursor (m/z)	Cone (V)	Energia de colisão (eV)
SA	137	23	21
ABA	263	30	13
AJ	209	30	15

Inicialmente obteve-se o íon molecular, respectivamente m/z 137, 263 e 209, por análise no modo SCAN (varrimento), sem aplicação de energia de colisão. Este valor corresponde à “Massa Molar – 1” ($[M-H]^-$), dado que estamos a trabalhar com o equipamento em modo negativo.

Posteriormente optimizou-se o método para análise no modo *Daughter Scan*. Nas Figuras 20, 21 e 22 apresentam-se os fragmentos obtidos para cada padrão estudado e para as condições de energia de colisão usadas.

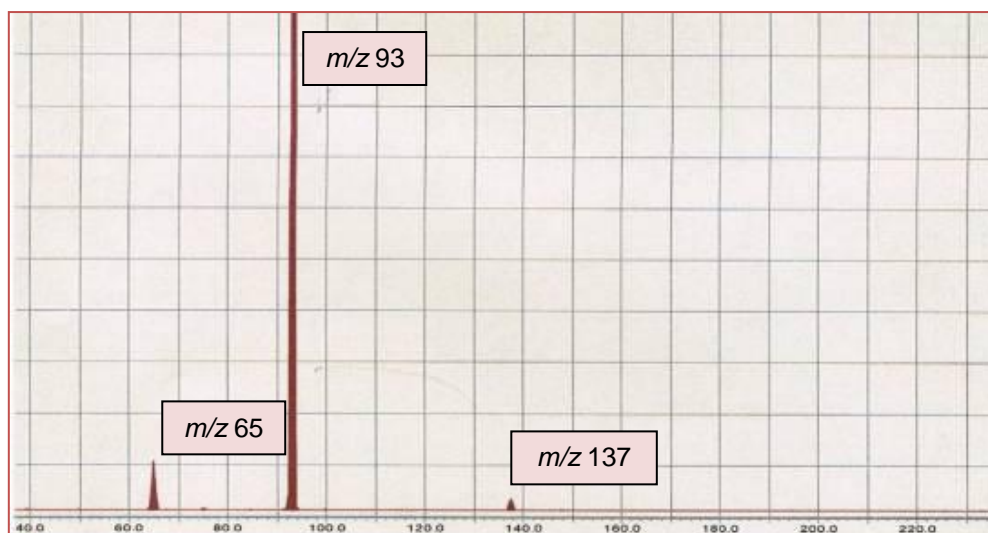


Figura 20- *Daughter Scan* do $[M-H]^-$ (m/z 137) do SA

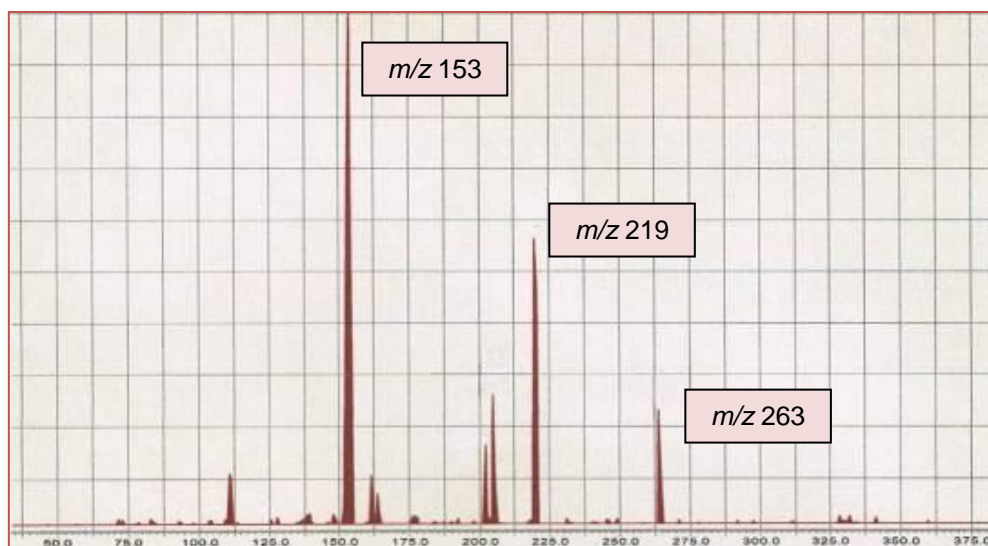


Figura 21 - *Daughter Scan* do $[M-H]^-$ (m/z 263) do ABA

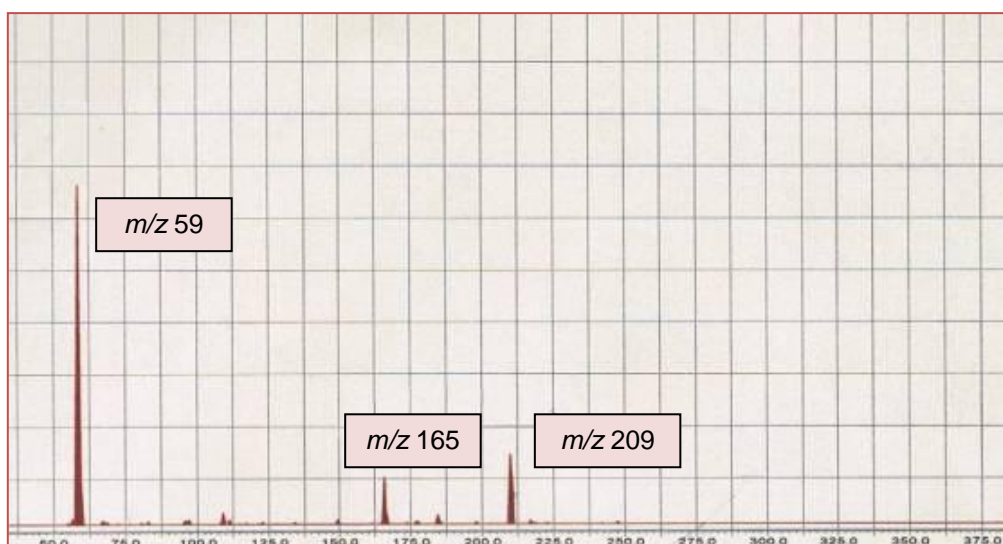


Figura 22 - *Daughter Scan* do $[M-H]^-$ (m/z 209) do JA

Este tipo de equipamento permite utilizar diferentes transições para fazer a detecção dos compostos. Assim, no primeiro quadrupolo escolhe-se o ião que se pretende usar, na câmara de colisão (segundo quadrupolo) induz-se a sua fragmentação e no terceiro quadrupolo detecta-se o sinal correspondente a um dos fragmentos obtidos. Este modo designado por MRM permite um aumento importante na sensibilidade do método por diminuição do ruído e por outro lado torna o método de análise mais específico. Selecionou-se a transição que produz um sinal mais elevado como transição de quantificação, e outra transição como qualificação (Quadro 5). A razão entre o sinal de cada transição é constante para o composto se se mantiverem as condições de análise. Esta será uma ferramenta para garantir que os compostos detectados nas amostras, para aquele tempo de retenção, correspondem mesmo ao pico do composto dos padrões em estudo.

Quadro 5 - Transições de quantificação e de qualificação determinadas

		Transição	Intensidade do sinal
SA	Quant	137 > 93	$4,46 \times 10^5$
	Qual	137 > 65	$1,85 \times 10^4$
ABA	Quant	263 > 153	$2,53 \times 10^5$
	Qual	263 > 219	$7,43 \times 10^4$
JA	Quant	209 > 59	$2,92 \times 10^3$
	Qual	209 > 165	$6,86 \times 10^5$

1.3. Análise de amostras resultantes de diferentes métodos de extracção por HPLC–DAD–MS/MS

As amostras preparadas pelo método Verbene “modificado” apresentam uma ligeira diferença das Verbene “normal”, pois foi adicionado 60 µl de acetato de sódio à fase orgânica antes de esta ser colocada no evaporador rotativo. As diferentes amostras foram analisadas e foram comparadas as áreas correspondentes aos picos dos compostos em estudo. Os resultados obtidos encontram-se no Quadro 6.

Quadro 6 - Comparação dos métodos de extracção Verbene “normal”, Verben “modificado”, Lopez-Carbonell e Wilbert

	Valor médio integração ± DesvPad				DPR (%)			
	V n	V m	L-C	W	V n	V m	L-C	W
SA	1613 ± 377,9	1657 ± 844,2	1097 ± 337,3	898 ± 173,2	23,4	51	30,8	19,3
ABA	2828 ± 266,8	2063 ± 671,6	1637 ± 42,4	6742 ± 320,3	9,4	32,6	2,6	4,8
JA	968 ± 175,3	809 ± 639,1	1135 ± 55,2	3856 ± 265,2	18,1	79	4,9	6,9

Legenda: “V n” – Verbene “normal”; “V m” – Verbene “modificado”; “L-C” – Lopez-Carbonell; “W” – Wilbert.

Pela análise desta tabela é possível verificar que o método Verbene “modificado” apresenta valores de desvio padrão relativo mais elevados que o método Verbene “normal”, não sendo por isso um método preciso. O método Lopez-Carbonell apresentou um desvio padrão relativo elevado na detecção do SA, e o valor médio de integração para os diferentes compostos é mais baixo, excepto na detecção do JA. Comparando o método Wilbert com o método Verbene “normal”, o desvio padrão relativo do método Wilbert é inferior para todos os compostos, mas o valor médio de integração do SA é muito inferior. Com base nos resultados, optou-se por utilizar o método Verbene “normal” para a extracção dos compostos.

1.4. Validação do método de análise por HPLC–DAD–MS/MS

A validação do método foi realizada tendo em vista a análise dos ácidos SA, ABA e JA em amostras de extractos de folha. Dado que o sistema de HPLC acoplado ao MS incluía também um detector de díodos (DAD) procedeu-se à validação do método utilizando os dois modos de detecção e foram comparados os resultados.

1.4.1. Especificidade do método

Nas condições de HPLC-MS/MS optimizadas, no modo MRM é possível seleccionar as massas que se pretende estudar e que são típicas dos compostos em estudo, sendo por isso um método mais específico.

Não foi possível analisar um branco da amostra dado que estes compostos estão naturalmente presentes nessa matriz. No entanto, como já foi verificado nos ensaios de optimização do método de extracção, o HPLC-DAD é um método menos específico pois a informação fornecida pelos espectros de absorção é muitas vezes insuficiente para tirar conclusões, principalmente em casos em que as matrizes das amostras são complexas, como os extractos obtidos a partir das folhas de cafeeiro.

1.4.2. Linearidade

O intervalo de linearidade é o intervalo de concentração em que ocorre proporcionalidade entre o valor de concentração e o sinal do detector obtido. O resultado da linearidade foi determinado pelo teste de Fisher-Snedecor.

Quadro 7 - Estudo da linearidade do método

	MS			DAD	
	SA	ABA	JA	SA	ABA
Gama de trabalho (ppm)	0,0313 a 5,0	0,063 a 1,0	0,0313 a 1,0	0,063 a 2,5	0,063 a 2,5
r^2	0,9998	0,9966	0,9983	0,9985	0,9998
Eq. Linear	$y = 12179x - 110$	$y = 6239x - 468$	$y = 3588x - 129$	$y = 542x - 12$	$y = 2068x + 35$
PG	0,42	41,03	2,50	18,01	0,93
F teste (n-1)	16,26	98,50	34,12	34,12	34,12

As rectas de calibração têm um coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,99, o que significa que 99% da variabilidade de Y, isto é, 99% da área calculada pelo equipamento é explicada pela equação da recta. O valor teste PG inferior a F teste comprova que a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento aos pontos experimentais significativamente melhor e por isso a função de calibração pode ser considerada linear (Quadro 7 e Anexo 1).

1.4.3. Precisão

- Repetibilidade do equipamento: Para testar a repetibilidade do equipamento analisou-se a mesma solução padrão, na concentração de 1,0 ppm. No Quadro 8 apresentam-se os valores médios de integração para o SA, JA e ABA com os detectores MS e DAD. Em relação aos valores de desvio padrão relativo obtidos, pode concluir-se que utilizando o DAD estes valores são mais elevados, o que indica uma maior variabilidade nos resultados obtidos. Como as áreas medidas são inferiores, esta variação pode estar associada a dificuldade no processo de integração.

Quadro 8 - Precisão do equipamento expressa em DPR (n=6)

	Valor médio de integração \pm DesvPad		DPR (%)	
	MS	DAD	MS	DAD
SA	13231 \pm 150	608 \pm 19	1,1	3,2
ABA	6034 \pm 83	2094 \pm 44	1,4	2,1
JA	3647 \pm 40	-	1,1	-

- Repetibilidade do método: Para testar a repetibilidade do método analisou-se três soluções padrão, a 0,0625, 1,0 e 10,0 ppm. Verificou-se que à medida que a concentração aumenta, diminui o desvio padrão relativo, para todos os compostos em estudo. Os valores de DPR com a detecção por MS variaram entre 1,2 e 14%, e para a detecção por DAD entre 0,3 e 14% (Quadro 9).

Quadro 9 - Precisão do método (n=6)

	Conc (ppm)	Valor médio de integração \pm DesvPad		DPR (%)	
		MS	DAD	MS	DAD
SA	0,0625	738 \pm 64	36 \pm 5	8,7	14
	1,0	12022 \pm 436	600 \pm 10	3,6	1,7
	10,0	113472 \pm 2098	5900 \pm 48	1,8	0,8
ABA	0,0625	193 \pm 31	109 \pm 8	14	7
	1,0	6071 \pm 300	2043 \pm 17	4,9	0,8
	10,0	106751 \pm 1233	20438 \pm 52	1,2	0,3
JA	0,0625	146 \pm 4	-	2,5	-
	1,0	3575 \pm 228	-	6,0	-
	10,0	58617 \pm 1126	-	1,9	-

- Precisão intermédia: Foram analisadas soluções padrão a uma concentração de 0,125 ppm para testar a precisão intermédia do equipamento (Anexo 2). Verifica-se que o método mais preciso para a detecção destes compostos é o MS porque apresenta um desvio padrão relativo inferior, excepto no caso do ABA (Quadro 10).

Quadro 10 - Precisão intermédia (n=12)

	Valor médio da concentração (ppm)		DPR (%)	
	MS	DAD	MS	DAD
SA	0,1279 ± 0,0073	0,119 ± 0,032	5,7	27
ABA	0,1249 ± 0,0082	0,084 ± 0,004	6,5	5
JA	0,1298 ± 0,013	-	10	-

1.4.4. Limites analíticos

Como foi referido anteriormente, o LD e o LQ podem ser calculados com base nos parâmetros da recta ou com base na razão sinal/ruído. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro 11:

Quadro 11 - LD e LQ determinado com base nos parâmetros da recta e na razão sinal/ruído

	Parâmetros da recta				Razão Sinal/Ruído			
	LD		LQ		LD		LQ	
	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD	MS	DAD
SA	0,091	0,760	0,305	2,540	0,0625	0,0625	0,125	0,125
ABA	0,110	0,720	0,366	2,400	0,0625		0,250	0,0313
JA	0,073		0,242		0,125		0,250	

Os valores mais baixos são obtidos através da razão sinal/ruído. Dado que foram efectuados ensaios de repetibilidade com soluções padrão com concentração de 0,0625 ppm para todos os compostos, e que os valores do desvio padrão obtidos são aceitáveis, considerou-se esta concentração como o ponto mais baixo da recta de calibração a ser utilizado no doseamento de amostras.

Com base nestes resultados é possível concluir que o detector de MS apresenta maior sensibilidade e como tal permite detectar e quantificar teores mais baixos destes compostos.

1.4.5. Exactidão

Os resultados referentes aos ensaios de recuperação encontram-se no Quadro 12. Estes resultados correspondem a valores muito baixos pelo que foram realizadas experiências com vista à optimização das condições de extracção.

Quadro 12 - Exactidão do método

	Taxa de recuperação (%)
SA	23
ABA	25
JA	26

1.4.5.1. Optimização das condições de extracção do método Verbene *et al.* (2002)

Inicialmente tentou-se avaliar o efeito do processo de concentração numa solução padrão de SA a 100 ppm. De um modo simples utilizou-se um espectrofotómetro e posteriormente procedeu-se à análise por HPLC (sistema 2). Na figura 23 apresentam-se os espectros obtidos.

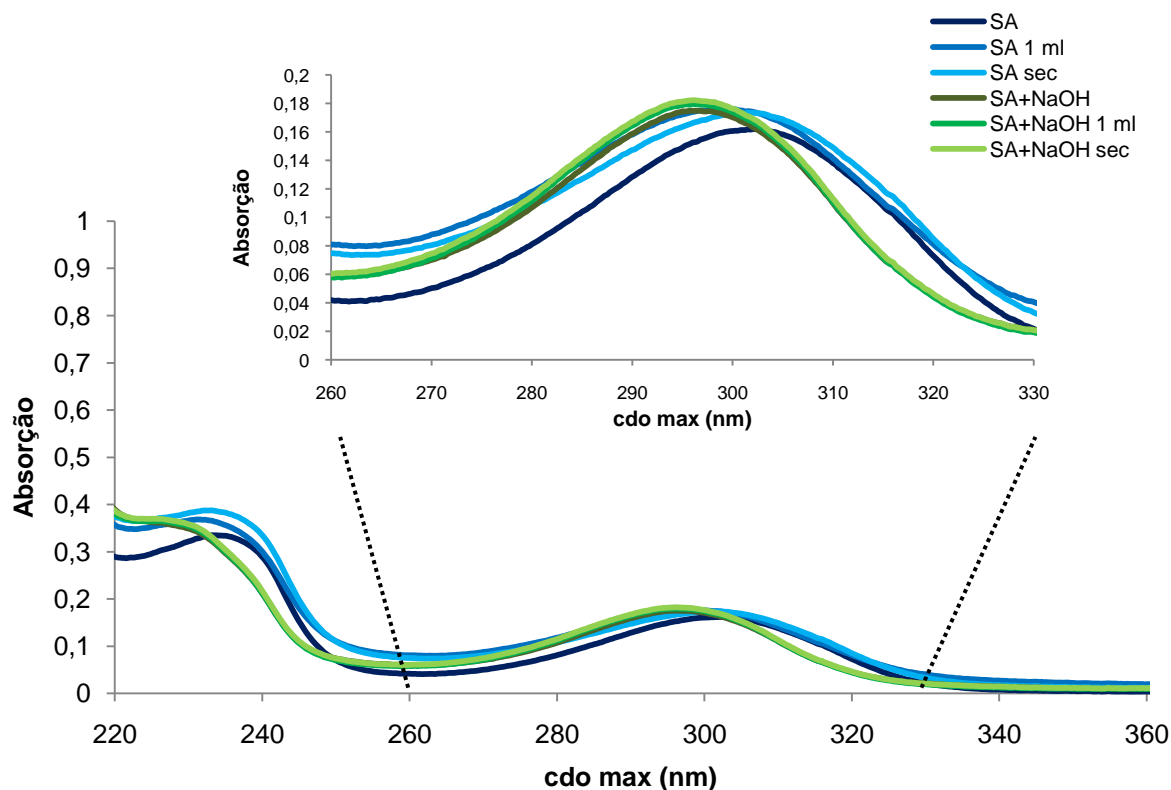


Figura 23 - Espectros de absorção de diferentes soluções de SA, para optimização do método (pág. 29, vide II.3.3.6.1.)

Os espectros das soluções de SA que contém NaOH sofreram um deslocamento para comprimentos de onda mais baixos, designado por efeito hipsocrómico, e a intensidade de banda é superior, designado por efeito hiperocrómico.

Dos resultados obtidos (Quadro 13) podemos concluir que o facto de deixar levar à secar ou recuperar 1 mL parece não conduzir a grandes diferenças na taxa de recuperação do SA. Também é possível verificar que a adição de hidróxido de sódio pouco intervém para melhorar a taxa de recuperação.

Quadro 13 - Valores de absorvância das amostras “SA” e “SA+NaOH”, após evaporação rotativa até à secura ou recuperando 1mL

	Abs	λ max (nm)
SA	0,1620	302,5
SA 1ml	0,1760	299,5
SA sec	0,1736	301,5
SA + NaOH	0,1749	296,8
SA + NaOH 1mL	0,1797	296,0
SA + NaOH sec	0,1823	296,0

Posteriormente foram preparadas amostras correspondentes a uma solução padrão de SA com uma concentração de 100 ppm, que foram sujeitas ao método Verbene descrito anteriormente, e outras em que foi adicionado hidróxido de sódio antes da primeira evaporação rotativa e acetato de sódio (CH_3COONa) antes da segunda evaporação rotativa. As amostras foram sempre recuperadas em 1 mL. O estudo destas amostras foi realizado no HPLC (2) e revelou que as alterações ao método levaram a um ligeiro aumento nas taxas de recuperação (Quadro 14).

Quadro 14 - Taxas de recuperação a várias etapas do processo de extracção descrito por Verbene *et al.* (2002) aplicado a soluções padrão de SA (pág. 30, vide II.3.3.6.1.)

	Área	Recuperação (%)	DesvPad
SA (100 ppm)	3407984		
SA 1 ev	2162710	63,46%	0,080
SA+NaOH 1ev	2306777	67,70%	0,084
SA 2ev	2461120	72,21%	0,101
SA+NaOH+CH₃COONa 2ev	2605920	76,47%	0,089

Tendo por base estes resultados, foram preparadas amostras a partir do extracto de folhas, pelo método Verbene, introduzindo as alterações referidas anteriormente, e com a sobrecarga na matriz de 100 ppm de cada composto. Os resultados obtidos com os extractos de folhas (Quadro 15) foram inferiores aos valores das taxas de recuperação da solução padrão de SA apresentados no Quadro 14. Este resultado poderá ser justificado pelo facto de se estar a trabalhar com uma matriz complexa o que dificulta a extracção destes compostos, pois a repetibilidade do método em estudo varia entre 1,2 e 14%.

Quadro 15 - Taxas de recuperação em extractos de folhas com as alterações indicadas por Verbene *et al.*

	Taxa de recuperação (%)
SA	44
ABA	29
JA	40

No Quadro 16 apresentam-se os resultados finais relativos à validação do método cromatográfico.

Quadro 16 - Resumo dos resultados referentes à validação do método cromatográfico

		MS/MS			DAD	
		SA	ABA	JA	SA	ABA
Linearidade	Gama de trabalho (ppm)	0,0313-5,0	0,0625-1,0	0,125-1,0	0,0625-2,5	0,0313-2,5
	r^2	0,9998	0,9966	0,9983	0,9985	0,9998
Repetibilidade do equipamento	DPR (%) 1,0 ppm	1,1	1,4	1,1	3,2	2,1
Repetibilidade do método	DPR (%) 1,0 ppm	3,6	4,9	6	1,7	0,8
Precisão intermédia	DPR (%)	5,7	6,5	10	27	5
LD		0,0625	0,0625	0,125	0,0625	-
LQ		0,125	0,25	0,25	0,125	0,0313
Exactidão	Taxa de recuperação	44	29	40		

2. Estudo da interacção *C. arabica* – *H. vastatrix*

2.1. Avaliação da germinação dos uredósporos e formação de apressórios

Procedeu-se à análise das fases de pré-penetração de *H. vastatrix* na variedade de cafeeiro S4 Agaro tendo-se verificado que às 24 h.a.i. a taxa de germinação foi de 75%, e que desses uredósporos germinados 47,6% formaram apressórios (Quadro 16).

2.2. Avaliação do processo de colonização

Pela observação do processo de infecção (Quadro 17 e Figura 24) é possível verificar que às 24 h.a.i. a maioria dos apressórios formados deu origem a hifas de penetração (69%), tendo-se observado âncoras em apenas 5% das zonas de infecção. A formação das primeiras células-mãe do haustório (CMH) com haustórios foi observada às 42 h.a.i., e não ultrapassou os 5%. A percentagem de zonas de infecção nas quais o fungo formou CMH com haustórios não passou dos 22% e 23% respectivamente às 72 e 96 h.a.i. O número médio de haustórios foi de três, tendo sido observados nas células subsidiárias e na 1ª camada do parênquima lacunoso. O fungo parou o seu crescimento às 72h.a.i..

**Quadro 17 - Diferenciação das primeiras estruturas de infecção de *H. vastatrix* em folhas de *C. arabica* S4
Agar em diferentes tempos após a inoculação**

% de zonas em que o fungo atingiu as fases de:						
Horas após inoculação	Apressório (1)	Hifa de Penetração (2)	Âncora (3)	CMH sem Haustório (4)	CMH com Haustório (5)	xp
15	31	69	0	0	0	1,69a
18	27	73	0	0	0	1,73a
24	27	68	5	0	0	1,78a
42	19	66	4	6	5	2,12b
48	17	48	15	5	15	2,53b
72	18	38	12	10	22	2,80c
96	14	40	12	11	23	2,89c

xp – média ponderada das fases de infecção ($xp_{42h} = (1 \times 19) + (2 \times 66) + (3 \times 4) + (4 \times 6) + (5 \times 5) / 100 = 2,12$). Os valores das médias ponderadas seguidos pela mesma letra não se diferenciam significativamente, de acordo com o teste MDS de Fisher ($P \leq 0,05$). CMH – Célula mãe do haustório.

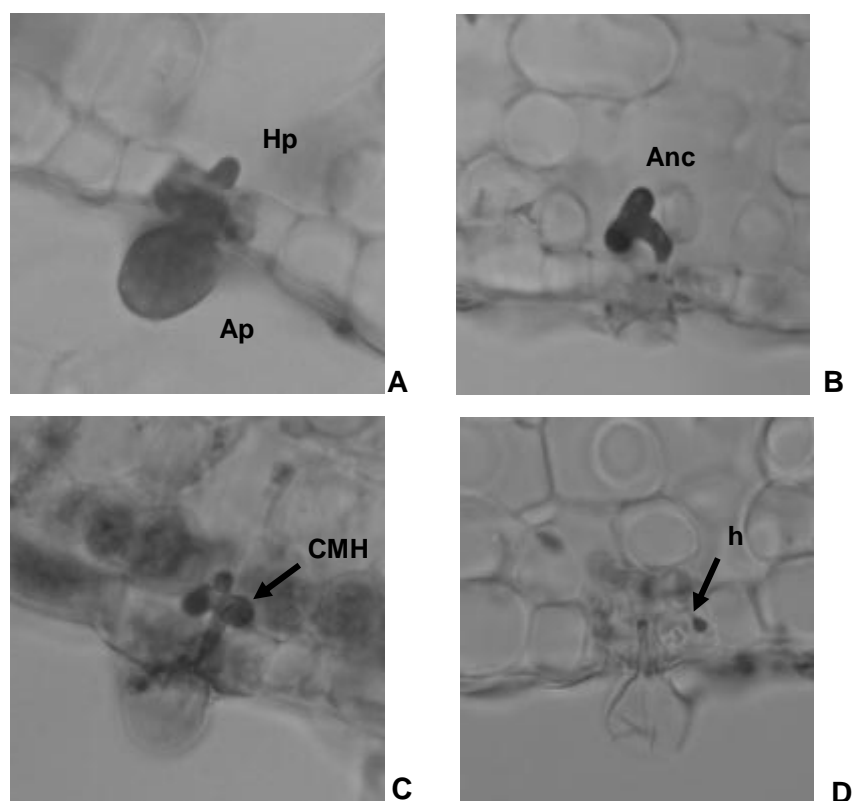


Figura 24 – Primeiras fases do processo de infecção. A – Apressório (Ap) e Hifa de penetração (Hp); B – Âncora (Anc); C – Célula mãe do haustório (CMH) (seta); D – Haustório (h) (seta) na célula subsidiária do estoma.

2.3. Análise e quantificação do ABA, SA e JA em folhas de *C. arabica* sãs e inoculadas com *H. vastatrix*

A quantificação, por HPLC-DAD-MS/MS, de ABA, SA e JA foi realizada em extractos de folhas de *C. arabica* sãs e inoculadas (interacção incompatível), colhidas a diferentes horas após a inoculação, em três ensaios independentes.

No primeiro ensaio não foram analisados os tempos 30h.a.i. e 36h.a.i., que se revelaram, ao longo do trabalho, essenciais para obter uma melhor ideia do perfil do comportamento dos compostos em estudo. Assim sendo, a análise dos resultados incide sobretudo sobre os dois últimos ensaios.

Os resultados obtidos para a variação do ABA ao longo do processo de infecção na interacção incompatível (Figura 25) mostraram um aumento superior ao valor do “Controlo” (pag 34, vide II.3.6.) nos dois ensaios, entre as 24h e as 30h.a.i., o que corresponde à fase de hifa de penetração. No entanto, como se pode verificar, esse aumento representa apenas 20% relativamente ao “Controlo”. Estes resultados vão de encontro ao estudo realizado por Pan *et al.* (2008), na interacção *Arabidopsis-Botrytis cinerea*, que detectaram um aumento do nível do ABA, embora as variações de concentração tenham sido mais subtis do que as de SA e de JA. O aumento que se verifica no segundo ensaio às 15h.a.i. não é coincidente com os restantes ensaios (Figura 25 e Anexo III).

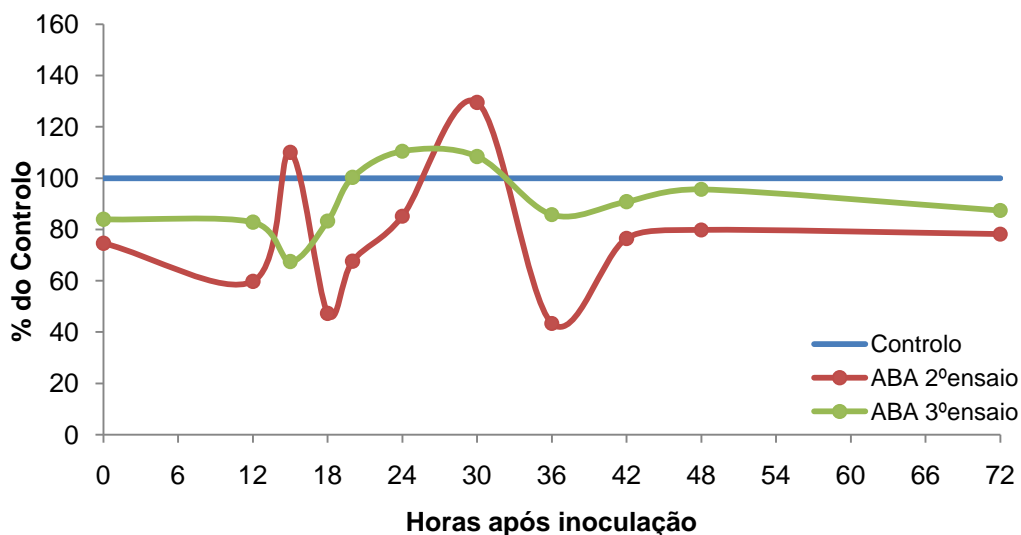


Figura 25 - Percentagem de ABA em folhas de *C. arabica* S4 Agaro inoculadas com *H. vastatrix* raça II (interacção incompatível) relativamente a folhas sãs (controlo), no segundo e terceiro ensaio, em diferentes horas após a inoculação. “Controlo” = média dos valores de ABA nas amostras “controlo” em diferentes horas após inoculação, calculado independentemente para cada um dos ensaios, ao qual se atribuiu o valor de 100%.

Na interacção incompatível foi detectado um aumento de SA entre as 20h e as 24h.a.i que foi consistente nos três ensaios (Figura 26 e Anexo III) e que corresponde à fase de hifa de penetração, e um segundo aumento a partir das 42h.a.i. que foi detectado apenas nos dois últimos ensaios e que corresponde à fase de haustório (Figura 26).

Estudos anteriores realizados em interacções incompatíveis cafeeiro-ferrugem indicaram que houve um aumento de actividade da enzima PAL em fases iniciais do processo de infecção (imediatamente antes ou coincidente com o início da observação da HR) bem como um aumento significativo da expressão do gene *pal* às 21 h.a.i. (Silva *et al.* 2002, Diniz *et al.* 2010). Noutras interacções incompatíveis cafeeiro-ferrugem foi observado o aumento da expressão de genes *pr1* e *pr10* por volta das 18-24 h.a.i. (Ramiro, 2009; Diniz *et al.*, 2010). A PAL tem sido referida por diversos autores como estando envolvida na síntese do SA e de outros compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides, enquanto que as proteínas PR são induzidas sistemicamente pelo SA, sendo o *pr1* utilizado como marcador desta via de sinalização (Vlot *et al.*, 2009). Guerra-Guimarães *et al.* (2009) detectaram o aumento da actividade de quitinases durante a resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem. Os resultados alcançados neste estudo sugerem que o aumento do SA detectado poderá ser responsável pela indução dos genes PR, e consequentemente pelo aumento da expressão de proteínas PR, como quitinases.

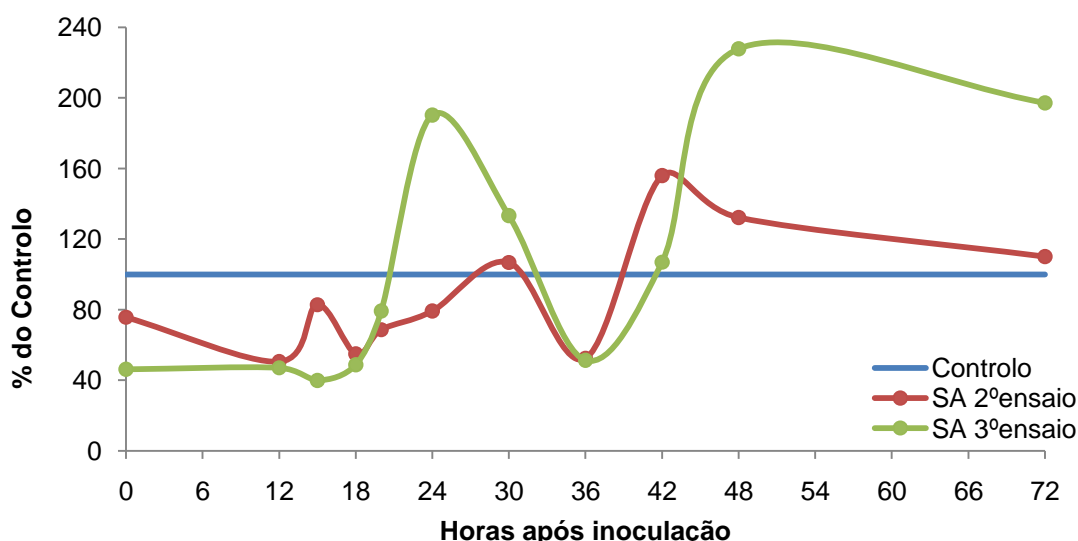


Figura 26 - Percentagem de SA em folhas de *C. arabica* S4 Agaro inoculadas com *H. vastatrix* raça II (interacção incompatível) relativamente a folhas sãs (controlo), no segundo e terceiro ensaio, em diferentes horas após a inoculação. “Controlo” = média dos valores de SA nas amostras “controlo” em diferentes horas após inoculação, calculado independentemente para cada um dos ensaios, ao qual se atribuiu o valor de 100%.

Em relação aos resultados obtidos para o JA (Figura 27), observou-se um primeiro aumento de concentração entre as 20h e as 24h.a.i. no terceiro ensaio, que já tido sido obtido também no primeiro ensaio (Anexo III), que corresponde à fase de hifa de penetração. Foi ainda detectado um segundo aumento de JA que se inicia à 48h.a.i. mas só se diferencia do valor do “Controlo” às 72 h.a.i., em que fungo já se encontra na fase de haustório.

Estudos realizados por diversos autores indicam que a via de sinalização do JA é marcada pela acção dos genes *lox* (Tuner *et al.*, 2002; Wasternack, 2007). Em algumas interacções incompatíveis cafeeiro-ferrugem foi observada a repressão do gene *13-lox* (Ramiro, 2009), no entanto Diniz *et al.* (2010) observaram um aumento moderado da sua expressão às 21 h.a.i. Contudo Diniz *et al.* (2010) concluíram ainda que, na interacção cafeeiro-ferrugem estudada, a via do SA parecia prevalecer relativamente à do JA. A conjugação dos resultados obtidos por aqueles autores com os resultados obtidos neste trabalho, parecem sugerir o fraco envolvimento do JA na indução da resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem. De facto, tem sido geralmente aceite que a via do JA está mais envolvida nas respostas de resistência a agentes patogénicos necrotróficos enquanto que a via do SA está mais envolvida na resistência contra os biotróficos, como é o caso da ferrugem (Reymond e Farmer, 1998; Glazebrook, 2005; Koorneef *et al.*, 2008; Bari e Jones, 2009; Jaiti, 2009; Vlot *et al.*, 2009).

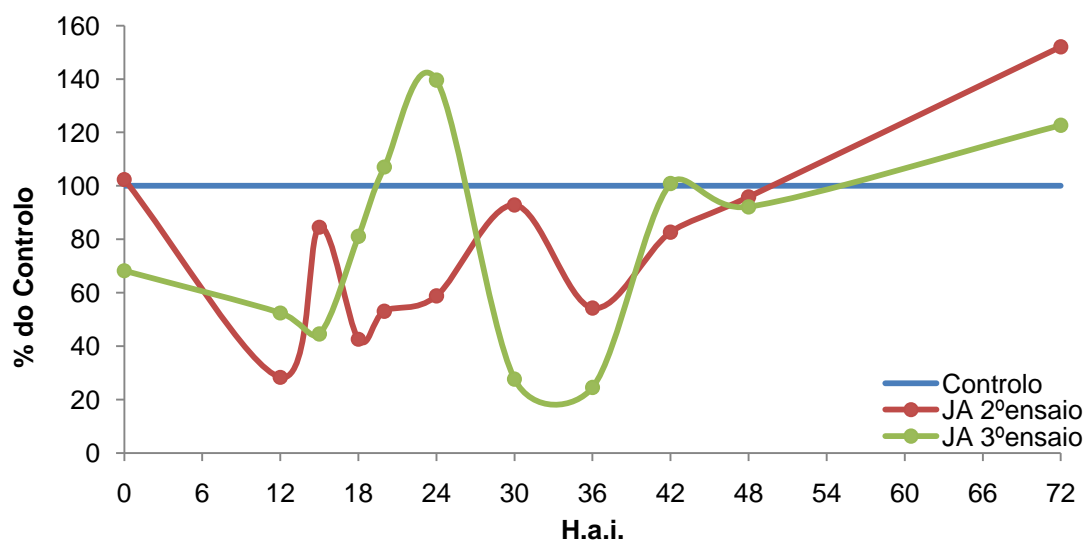


Figura 27 - Percentagem de JA em folhas de *C. arabica* S4 Agaro inoculadas com *H. vastatrix* raça II (interacção incompatível) relativamente a folhas sãs (controlo), no segundo e terceiro ensaio, em diferentes horas após a inoculação. “Controlo” = média dos valores de JA nas amostras “controlo” em diferentes horas após inoculação, calculado independentemente para cada um dos ensaios, ao qual se atribuiu o valor de 100%.

IV. Conclusões e perspectivas

No presente trabalho foram estudados diversos métodos de extracção de modo a eleger o mais adequado ao estudo dos extractos de folhas de *C. arabica*, tendo sido seleccionado o método descrito por Verbene *et al.* (2002), originalmente utilizado na análise de SA em folhas de tabaco. A aplicação do método a folhas de cafeeiro conduziu, contudo, a valores de exactidão inferiores (entre 29 e 40%) aos referidos por aqueles autores (71 a 91%). Porém, a exactidão foi consideravelmente superior (72 a 76%, valores próximos dos referidos por Verbene e sua equipa) quando se analisou apenas a solução padrão de SA, o que leva a concluir que o extracto de folhas dificultará a extracção destes compostos. Tal dever-se-á ao facto do método escolhido ter sido optimizado para a extracção de SA em folhas de *Nicotiana tabacum*, anatomicamente diferentes das de cafeeiro.

No estudo de optimização do método foram utilizados diferentes equipamentos (HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS/MS e espectrofotometria UV), verificando-se que o sistema HPLC-DAD-MS/MS foi o mais adequado, por ser mais específico e permitir a determinação conjunta dos três compostos, visto que o JA não absorve na gama de UV.

Nos estudos de validação do método verificou-se que este era específico e, através do teste de Fisher-Snedecor, que a calibração polinomial não conduzia a um melhor ajustamento, e como tal considerou-se o método de análise linear na gama de concentrações estudadas. Tanto a repetibilidade do equipamento como a do método apresentaram valores favoráveis, com desvios padrão relativos abaixo dos 14%, verificando-se valores de precisão intermédia inferiores a 10% utilizando o detector MS. Os limites de detecção e de quantificação calculados são inferiores quando se utiliza o detector MS. Considerou-se como LQ o valor de 0,0625 ppm para todos os compostos, pois foi a concentração do ponto mais baixo da curva de calibração onde foi estudada a precisão. Os, já referidos, baixos valores de exactidão obtidos conduziram a modificações do método que estão actualmente a ser avaliadas em trabalho a decorrer.

A avaliação do processo de colonização da ferrugem nos tecidos permitiu observar que às 15 h.a.i. o fungo atingiu a fase de hifa de penetração em 69% dos locais de infecção, que às 24 h.a.i. se diferenciaram em fase de âncora (5%) e só às 42 h.a.i. em células-mãe do haustório (CMH) com haustório.

A quantificação de ABA, SA e JA durante o estudo da interacção incompatível *C. arabica*–*H. vastatrix* mostrou que houve um primeiro aumento de concentração de todos os compostos entre as 20h.a.i. e as 30h.a.i. o que nos leva a considerar o possível envolvimento destes compostos na reacção de hipersensibilidade. Houve um segundo aumento, desta vez apenas para o JA e o SA, por volta das 48-72h.a.i., levando a crer que

estes compostos estão envolvidos em respostas de defesa mais tardias, como a lenhificação ou a deposição de calose nas paredes celulares.

Os resultados obtidos para o SA vão de encontro a estudos realizados por diversos autores que verificaram um aumento significativo de actividade da enzima PAL e da expressão do gene *pal*, da expressão de genes *pr1* e *pr10* e da actividade de quitinases na resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem (Silva *et al.*, 2002; Guerra-Guimarães *et al.*, 2009; Ramiro, 2009; Diniz *et al.*, 2010). Os valores de JA juntamente com os estudos de expressão dos genes, poderão ser indicativos do fraco envolvimento do JA na indução da resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem. Estes resultados vêm corroborar os de outros autores que defendem que a via de sinalização do SA é a mais utilizada contra agentes patogénicos biotróficos, como a ferrugem, enquanto que as respostas dependentes da sinalização do JA actuam essencialmente contra os necrotróficos e insectos (Reymond e Farmer, 1998; Glazebrook, 2005; Koorneef *et al.*, 2008; Bari e Jones, 2009; Jaiti, 2009; Vlot *et al.*, 2009).

Em trabalhos futuros será essencial testar outros métodos de preparação da amostra de forma a aumentar a taxa de recuperação dos compostos, principalmente do SA, que este trabalho mostrou poder estar envolvido na via de sinalização da resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem, bem como dos restantes compostos (JA e ABA), a fim de confirmar, ou não, a sua participação neste mecanismo.

No futuro será necessário realizar mais ensaios, não só na interacção incompatível, como estudar também a interacção compatível (susceptível), para clarificar o possível envolvimento destes compostos, em particular do SA e JA, na resistência do cafeeiro à ferrugem alaranjada.

V. Referências bibliográficas

- Almeida M.H.G.A. (2008/09). Apontamentos da disciplina de Tecnologia dos Produtos Tropicais, Lisboa, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa.
- Agrios G. N., (2005). *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. 5th edition. USA. 922.
- Andreasen K., Bremer B., (2000). Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data. *American Journal of Botany* **87**: 1731 – 1748.
- Bari, R., Jones J. D. G., (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**: 473 – 488.
- Bettencourt A. J., Noronha-Wagner M., (1971). Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. *Agronomia Lusit* **31**: 285 – 292.
- Bettencourt A. J., (1981). Melhoramento genético do cafeeiro – Transferência de factores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berck & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L.. Junta de Investigações Científicas do Ultramar, Centro de Investigação de Ferrugens do Cafeeiro. Oeiras.
- Bettencourt A. J., (1982). Estudo genético da resistência das plantas aos fungos – Projecto de análise da resistência do Híbrido-de-Timor à *Hemileia vastatrix*. Junta de Investigações Científicas do Ultramar, Centro de Investigação de Ferrugens do Cafeeiro. Oeiras.
- Bettencourt A. J., Rodrigues Jr., C. J., (1988). Principles and Practice of Coffee Breeding for Resistance to Rust and Other Diseases. *Coffee, v. 4 – Agronomy. Elsevier Applied Science, London*. 199 – 234.
- Clifford M. N., Willson K. C., (1985). Coffee: Botany, Biochemistry e Production of Beans and Beverage. Croom Helm Ltd, London.
- Correia A. M. N. G., (1990). Influência da Torra na Evolução dos Ácidos Clorogénicos do Café. Tese de Doutoramento. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 180 – 181.
- Coutinho T. A., Rijkenberg F. H. J., Van Asch M. A. J., (1994). The effect of leaf age on infection of *Coffea* genotypes by *Hemileia vastatrix*. *Plant Pathology* **43**: 97 – 103.
- Creelman R. A., Tierney M. L., Mullet, J. E., (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Plant Biology*, v. **89**: 4938 – 4941.
- Crotti Antonio E. M., (2006). Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de iões de substâncias orgânicas debaixo peso molecular. *Quim. Nova*, v. **29**, nº 2: 287 – 292.

- Davis A. P., Govaerts R., Bridson D. M., Stoffelen P., (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**: 465 – 512.
- Davis A. P., Chester M., Maurin O., Fay, M., (2007). Searching for the relatives of *Coffea* (Rubiaceae, Iroxoideae): the circumscription and phylogeny of *Coffeae* based on plastid sequence data and morphology. *American Journal of Botany* **94**: 313 – 329.
- Diniz I., Talhinhos P., Azinheira H. G., Várzea V., Oliveira H., Fernandez D., Silva M.C., (2010). Cellular and molecular responses in host and non-host coffee-rust interactions (*Hemileia vastatrix* and *Uromyces vigneae*). *Proceedings of the 23th International Conference on Coffee Science (ASIC)*, 3-7 Oct, Bali, Indonesia (em publicação).
- Durgbanshi A., Arbona V., Pozo O., Miersch O., Sancho J. V., Gómez-Cadenas A., (2005). Simultaneous Determination of Multiple Phytohormones in Plant Extracts by Liquid Chromatography – Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**: 8437 – 8442.
- Eskes A. B., Kushalappa A. C., (1989). Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and Management. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Fernandes R. C., Evans H. C., Barreto R. W., (2009). Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology*, v. **34**, nº 2: 108 – 113.
- Fernandez D., Santos P., Agostini C., Bon M. C., Petitot A. S., Silva M. C., Guerra-Guimarães L., Ribeiro A., Argout X., Nicole M., (2004). Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology*, v. **5**, **6**: 527 – 536.
- Ferrão J. E. M., (2005). A Aventura das Plantas e os Descobrimentos Portugueses. Chaves Ferreira Publicações. Lisboa. 288.
- Ferrão J. E. M., (2009). O Café, a Bebida Negra dos Sonhos Claros. Chaves Ferreira Publicações. Lisboa. 224.
- Furlani Jr. E., Borges W. L. B., Lazarini E., Fazouli L. C., Andreotti M., (2007). Avaliação de cultivares de café arábica em região marginal. *Maringá*, v. **29**, nº 2: 197 – 203.
- Ganesh D., Petitot A. S., Silva M. C., Alary R., Lecouls A. C., Fernandez D., (2006). Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Science* **170**: 1045 – 1051.
- Glazebrook J., (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* **43**: 205 – 227.

- Gómez-Cadenas A., Pozo O. J., Garcia-Augustin, P., Sancho J. V., (2002). Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **13**: 228 – 234.
- Guerra-Guimarães L., (2004). Proteínas relacionadas com a patogenicidade na interacção cafeeiro-ferrugem alaranjada. Tese de douturamento em Biologia, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal.
- Guerra-Guimarães L., Silva M. C., Struck C., Loureiro A., Nicole M., Rodrigues Jr. C. J., Ricardo C. P. P., (2009). Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. *Biologia Plantarum* **53**: 4, 702 – 706.
- Guerra-Guimarães L., Cardoso S., Martins Inês, Loureiro A., Bernardes da Silva A, Várzea VMP, Silva MC. (2008) Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions *Proceedings of the 22th International Conference on Coffee Science (ASIC)*, 14-19 Sept, Campinas, Brasil, Pp. 1036–1039 .
- Guerra-Guimarães L, Silva MC, Struck C, Loureiro A, Nicole M, Rodrigues Jr. CJ, Ricardo CPP (2009). Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. *Biologia Plantarum* **53**: 702-706.
- Guzzo SD & Martins EMF (1996). Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Phytopathology* **144**: 449-454.
- Harris D. C., (1999). Quantitative Chemical Analysis, Fifth Edition. W. H. Freeman and Company. 712 – 749.
- Heath M. C., (1991). Evolution of resistance to fungal parasitism in natural ecosystems. *New Phytol.* **119**: 331 – 343.
- Heath M. C., (1992). Structural changes at plant-fungal interface. *Int. J. Plant Sci.* **153**: 3, 182 – 189.
- Heath M. C., (1997). Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Annals of Botany* **80**: 713 – 720.
- Heath M. C., (2000) a. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Bio.* **44**: 321 – 334.
- Heath M. C., (2000) b. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 315 – 319.
- Herrera J. C., Combes M. C., Cortina H., Alvaro G., Lashermes P., (2002). Gene introgression into *Coffea Arabica* by way of triploid hybrids (*C. Arabica* x *C. canephora*). *Heredity* **89**: 488 – 494.
- Jaiti F., Verdeil J. L., Hadrami I. E., (2009). Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**: 84 – 90.

- Koorneef A., Leon-Reyes A., Ritsema T., Verhage A., Den Otter F. C., Van Loon L. C., Pieterse C. M. J., (2008). Kinetics of Salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology* **147**: 1358 – 1368.
- Kunkel B. N., Brooks, D. M., (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325 – 331.
- Ky C. L., Noirot M., Hamon S., (1997). Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). *J. Agric. Food Chem.* **45**: 786 – 790.
- Lashermes P., Combes M. C., Robert J., Trouslot P. D'Hont A., Anthony F., Charrier A., (1999). Molecular characterization and origin of *Coffea Arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics* **261**: 259 – 266.
- Lashermes P., (2004). Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. Arabica* L.. *Theor Appl Genet* **109**: 1311 – 1317.
- Lecouls A. C., Petitot A. S., Marmey P., Silva M. C., Guerra-Guimarães L., Fernandez D., Nicole M., (2006). Physiology and defence mechanisms to pathogens in tropical woody plants. *Molecular Biology of Tropical Plants. Recent Research Developments in Microbiology*, Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India. 1 – 15.
- López-Carbonell M., Jáuregui O., (2005). A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 407 – 411.
- López-Carbonell M., Gabasa M., Jáuregui O., (2009). Enhanced determination of abscisic acid (ABA) and abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in *Cistus albidus* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 256 – 261.
- Lourenço M. O. G., Moreira A. P., (1997). Notas elementares de Cromatografia Gás-Líquida. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 1 – 28.
- Maxemiuc-Naccache V, Braga MR, Dietrich SMC (1992). Chitinase and β -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Revista Brasileira de Botânica* **15**: 145-150.
- Mayne W. W., (1932). Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* B. & Br. *Nature* **129**: 510.
- Mayne W. W., (1935). Annual report of the coffee scientific officer 1934-1935. Mysore Coffee Experimental Station Bulletin **13**: 28.
- Mendham J., Denney R. C., Barnes J. D., Thomas M., (2002). Vogel: Análise Química Quantitativa, 6ª Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro. 144 – 156.
- Mysore K. S., Ryu C-M., (2004). Nonhost resistance: how much do we know?. *Trends in Plant Science*, v. **9**, nº 2: 97 – 104.

- Noronha A. A., (1959). Comportamento de algumas selecções de *Coffea Canephora* em relação à *Hemileia vastatrix* B. et Br., Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Osório N., (2004). Lessons from the world coffee crisis: a serious problem for sustainable development. Internacional Coffee Organization, 6.
- Osório N., (2005). Action to avoid further coffee price crises. Internacional Coffee Organization, 3.
- Pan X., Welti R., Wang X., (2008). Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**: 1773 – 1781.
- Pearl H. M., Nagai C., Moore P. H., Steiger D. L., Osgood R. V., Ming R., (2004). Construction of a genetic map for arabica coffee. *Theor Appl Genet* **108**: 829 – 835.
- Peck S. C., (2003). Early phosphorylation events in biotic stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 334 – 338.
- Prakash N. S., Marques D. V., Varzea V. M. P., Silva M. C., Combes M. C., Lashermes P., (2004). Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. Arabica* L.. *Theor. Appl. Genet* **109**: 1311 – 1317.
- Pizzutti I. R., (2006). Validação de métodos multiresíduos de extracção e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS; Tese de Doutorado, Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 70.
- Ramiro D. (2009). Caractérisation des mécanismes de résistance impliqués dans les réponses du caféier (*Coffea arabica*) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*): de la formation des haustoria à l'expression quantitative des gènes. Tese de Thèse de Doctorat. Montpellier-SupAgro. 229 pp.
- Ramiro D., Escoute J., Petitot A. S., Nicole M., Maluf M. P., Fernandez D., (2009). Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology* **58**: 944 – 955.
- Reymond P., Farmer E. E., (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 404 – 411.
- Ribani M., Bottoli C. B. G., Coullius C. H., (2004). Validação do método cromatográfico para análise de etanol em amostra de sangue de interesse forense. *Química Nova*. **27**: 771 – 780.
- Ribeiro F.A.L., Ferreira M.M.C., Morano S.C., Silva L.R., Schneider R.P. (2008). Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos multivariados. *Química Nova*, v. **31**, nº 1: 164-171.

- Rijo L, Vasconcelos M.I. (1984). Formação de calose e lenhina em combinações incompatíveis *Coffea* spp. - *H. vastatrix*. *Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro*, 17-20 Outubro 1983, Oeiras. Pp. 269-279.
- Rijo L., Silva M. C., Vasconcelos M. I., (1990). Alguns aspectos morfológicos e citológicos do uredósporo e tubo germinativo de *Hemileia vastatrix* e da reacção de incompatibilidade da associação *Coffea* spp. – *Hemileia vastatrix*. *Revista de Ciências Agrárias*, v. **XIII**: nº 3 e 4.
- Rodrigues Jr., C. J., Bettencourt, A. J., Rijo L., (1975). Races of the Pathogen and Resistance to Coffee Rust. *Annual Review Phytopathology* **13**: 49 – 70.
- Rodrigues Jr., C. J., (1980). Germinação anómala dos uredósporos de *Hemileia vastatrix*, o agente casual da ferrugem alaranjada do cafeeiro. *Garcia de Orta, Sér. Est. Agron.* **7** (1 – 2): 17 – 20.
- Rodrigues Jr. C.J., Rijo L., Medeiros E.F. (1982). Induction of flecks and tumefactions on coffee leaves by incompatible and compatible, viable and non-viable uredosporos of *Hemileia vastatrix* and other rusts, and by their leachates. *Garcia da Orta, Sér. Est. Agron.* **9** (1 – 2):105-110.
- Rodrigues Jr., C. J., (1985). Ferrugens de Plantas Tropicais. *Curso de Aperfeiçoamento de Patologia das Plantas Tropicais e Subtropicais*. 14 a 31 Outubro, Oeiras. 53 – 82.
- Rojas ML, Montes de Gómez V, Ocampo CA (1993). Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**: 209-219.
- Ruas P.M., Ruas C., Rampim L., Carvalho V., Ruas E.A., Sera T. (2003). Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. *Genetic and Molecular Biology* **26**: 319-327.
- Sera G. H., Sera T., Ito D. S., Azevedo J. A., Mata J. S., Dói D. S., Filho C. R., Kanayama F. S., (2007). Resistance to Leaf Rust in Coffee Carrying S_H3 Gene and others S_H Genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**. 753 – 757.
- Silva MC, Rijo L, Rodrigues Jr. CJ & Vasconcelos MI (1992). Histological study of the heterozygosity effect of coffee resistance genes S_H1 and S_H4S_H5 towards *Hemileia vastatrix*. *Biotéria Genética* **XIII**: 169-184.
- Silva M. C., Nicole M., Guerra-Guimarães L., Rodrigues Jr., C. J., (2002). Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **160**: 169 – 183.

- Silva M. C., Várzea V., Guerra-Guimarães L., Azinheira H. G., Fernandez D., Petitot A. S., Bertrand B., Lashermes P., Nicole M., (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18 v. 1: 119 – 147.
- Silva M. C., Guerra-Guimarães L., Loureiro A., Nicole M. R., (2008). Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**: 29 – 38
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., (1997). Fundamentals of Analytical Chemistry, seven edition. Saunders College Publishing, USA. 701 – 714.
- Soares A. M. S., Machado O. L. T., (2007). Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reactivas de oxigénio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. v. 1, nº 1: 9 – 19.
- Tamogami S., Kodama, O., (1998). Quantification of amino acid conjugates of jasmonic acid in rice leaves by high-performance liquid chromatography-turboionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **822**: 310 – 315.
- Thuston H. D., (1998). Coffe Rust, *Tropical Plant Diseases*. APS Press, USA. 123 – 128.
- Van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J., (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology* **44**: 135 – 162.
- Várzea V. M. P., Marques D. V., (2005). Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. *Coffee* durable resistance. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 53 – 69.
- Verbene M. C., Brouwer N., Delbianco F., Linthorst H. J. M., Bol J. F., Verpoorte R., (2002). Method for the Extraction of the Volatile Compound Salicylic Acid from Tobacco Leaf Material. *Phytochemical Analysis*. **13**: 45 – 50.
- Vlot A. C., Dempsey D'M. A., Klessig D. F., (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review Phytopathology* **47**: 177 – 206.
- Wilbert S. M., Ericsson L. H., Gordon M., (1998). Quantification of Jasmonic Acid, Methyl Jasmonate, and Salicylic Acid in Plants by Capillary Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. **257**: 186 – 194.
- Wrigley G., (1988). Coffee, Tropical Agriculture Series. Longman Scientific & Technical, London.
- Yalpani N., Silverman P., Wilson T. M. A., Kleier D. A., Raskin I., (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell*. v. **3**: 809 – 818.
- Zhang F. J., Jin Y. J., Xu X. Y., Lu R. C., Chen H. J., (2008). Study of the extraction, purification and quantification of jasmónico acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants. *Phytochemical Analysis* **19**: 560 – 567.

Zhou R., Squires T. M., Ambrose S. J., Abram S. R., Ross A. R., Cutler A. J., (2003). Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A*. **1010**: 75 – 85.

➤ Webgrafia:

- CABI database. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/genusrecord.asp?RecordID=16158>. Acesso em Abril, 2010
- www.fao.org, Acesso em Abril, 2010
- www.apsnet.org, Acesso em Setembro 2010
- www.ico.org, Acesso em Abril e Maio, 2010

VI. Anexos

Anexo I – Estudos da linearidade

Estudo da linearidade do SA por MS

Concentração (ppm)	Quadrado da Concentração (ppm)	Valor da Integração
0,0313	0,00097969	573
0,0625	0,003969	644
0,125	0,015625	1243
0,250	0,0625	2546
0,50	0,25	6095
1,0	1,0	12569
2,5	6,25	29825
5,0	25,0	60954
10,0	100	117650

Sumário dos Resultados

Linear		Polinomial	
<i>Estatística de regressão</i>		<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999869742	R múltiplo	0,999879739
Quadrado de R	0,999739501	Quadrado de R	0,999759493
Quadrado de R ajustado	0,999696084	Quadrado de R ajustado	0,99966329
Erro-padrão (Sy/x)	371,0753486	Erro-padrão (Sy/x)	390,5829334
Observações	8	Observações	8
ANOVA	gl	ANOVA	gl
Regressão	1	Regressão	2
Residual	6	Residual	5
Total	7	Total	7
<i>Coeficientes</i>		<i>Coeficientes</i>	
Interceptar	-110,1289078	Interceptar	39,37543199
Variável X1	12179,47655	Variável X1	11971,43763
		Variável X2	43,08847847

DS	63406,35
PG	0,42
F	16,26

Estudo da linearidade do SA por DAD

Concentração (ppm)	Quadrado da Concentração (ppm)	Valor da Integração
0,0313	0,00097969	
0,0625	0,003969	34
0,125	0,015625	69
0,250	0,0625	125
0,50	0,25	300
1,0	1,0	604
2,5	6,25	1348
5,0	25,0	3348
10,0	100	5947

Sumário dos Resultados

Linear		Polinomial	
<i>Estatística de regressão</i>		<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997737676	R múltiplo	0,998332449
Quadrado de R	0,995480471	Quadrado de R	0,996667679
Quadrado de R ajustado	0,994727216	Quadrado de R ajustado	0,99533475
Erro-padrão (Sy/x)	154,1304229	Erro-padrão (Sy/x)	144,9792447
Observações	8	Observações	8
ANOVA		ANOVA	
	gl		gl
Regressão	1	Regressão	2
Residual	6	Residual	5
Total	7	Total	7
<i>Coeficientes</i>		<i>Coeficientes</i>	
Interceptar	1,749890172	Interceptar	55,27638596
Variável X1	606,4923923	Variável X1	682,5320058
		Variável X2	7,918460249

DS	37442,22
PG	1,78
F	16,26

Estudo da linearidade do ABA por MS

Concentração (ppm)	Quadrado da Concentração (ppm)	Valor da Integração
0,0313	0,00097969	41
0,0625	0,003969	138
0,125	0,015625	369
0,250	0,0625	915
0,50	0,25	2414
1,0	1,0	5912
2,5	6,25	18250
5,0	25,0	41759
10,0	100	101779

Sumário dos Resultados

Linear		Polinomial	
<i>Estatística de regressão</i>		<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,996561227	R múltiplo	0,99984043
Quadrado de R	0,99313428	Quadrado de R	0,999680886
Quadrado de R ajustado	0,990845707	Quadrado de R ajustado	0,999361773
Erro-padrão (Sy/x)	228,2587931	Erro-padrão (Sy/x)	60,27021582
Observações	5	Observações	5
ANOVA		ANOVA	
	gl		gl
Regressão	1	Regressão	2
Residual	3	Residual	2
Total	4	Total	4
<i>Coeficientes</i>		<i>Coeficientes</i>	
Interceptar	-468,3401864	Interceptar	-160,3274892
Variável X1	6238,626384	Variável X1	4047,38247
		Variável X2	2031,813986

DS	149041,23
PG	41,03
F	98,50

Estudo da linearidade do ABA por DAD

Concentração (ppm)	Quadrado da Concentração (ppm)	Valor da Integração
0,0313	0,00097969	
0,0625	0,003969	110
0,125	0,015625	212
0,250	0,0625	420
0,50	0,25	1040
1,0	1,0	2063
2,5	6,25	5121
5,0	25,0	11671
10,0	100	20610

Sumário dos Resultados

Linear		Polinomial	
<i>Estatística de regressão</i>		<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997986004	R múltiplo	0,9991165
Quadrado de R	0,995976064	Quadrado de R	0,9982337
Quadrado de R ajustado	0,995305409	Quadrado de R ajustado	0,9975272
Erro-padrão (Sy/x)	504,9027545	Erro-padrão (Sy/x)	366,43675
Observações	8	Observações	8
ANOVA	gl	ANOVA	gl
Regressão	1	Regressão	2
Residual	6	Residual	5
Total	7	Total	7
<i>Coeficientes</i>		<i>Coeficientes</i>	
Interceptar	38,63852083	Interceptar	-217,61955
Variável X1	2106,075308	Variável X1	2470,1149
		Variável X2	-37,909625

DS	858181,30
PG	6,39
F	16,26

Estudo da linearidade do JA por MS

Concentração (ppm)	Quadrado da Concentração (ppm)	Valor da Integração
0,0313	0,00097969	67
0,0625	0,003969	151
0,125	0,015625	288
0,250	0,0625	635
0,50	0,25	1655
1,0	1,0	3495
2,5	6,25	10246
5,0	25,0	25139
10,0	100	54110

Sumário dos Resultados

Linear		Polinomial	
<i>Estatística de regressão</i>		<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998301605	R múltiplo	0,999073686
Quadrado de R	0,996606095	Quadrado de R	0,99814823
Quadrado de R ajustado	0,995757618	Quadrado de R ajustado	0,996913717
Erro-padrão (Sy/x)	86,7550241	Erro-padrão (Sy/x)	73,99589237
Observações	6	Observações	6
ANOVA	gl	ANOVA	gl
Regressão	1	Regressão	2
Residual	4	Residual	3
Total	5	Total	5
<i>Coeficientes</i>		<i>Coeficientes</i>	
Interceptar	-129,2058757	Interceptar	-66,56884507
Variável X1	3587,961334	Variável X1	3028,194503
		Variável X2	545,001106

DS	13679,56
PG	2,50
F	34,12

Anexo II – Cartas de Controle

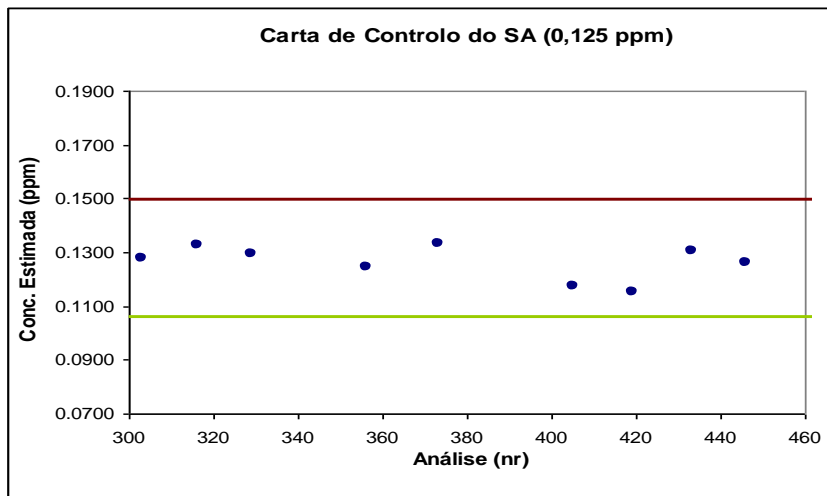


Figura II.1 - Carta de controle do SA pelo dectetor MS/MS

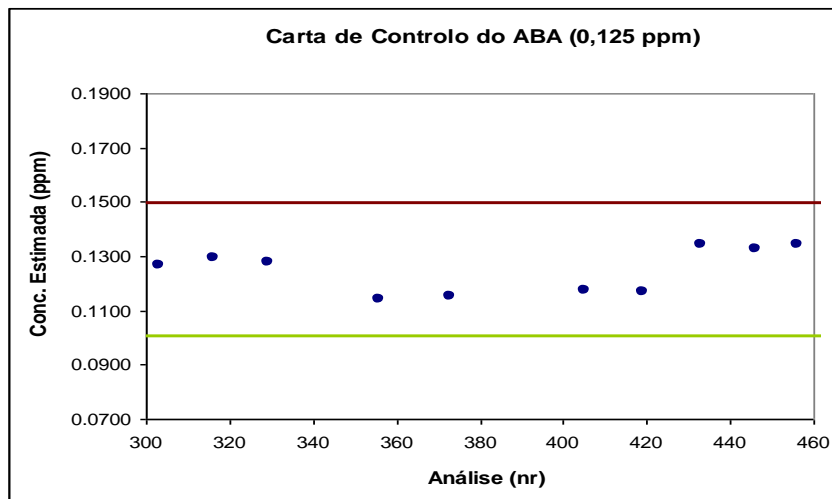


Figura II.2 - Carta de controle do ABA pelo detector MS/MS

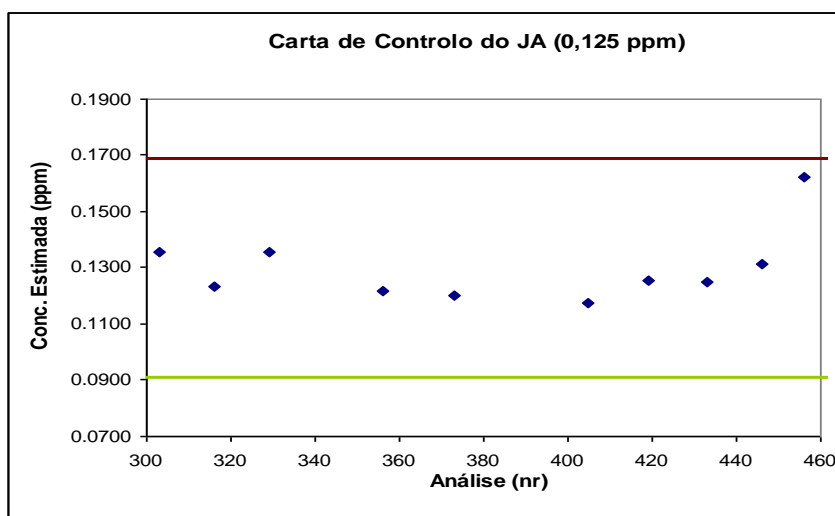


Figura II.328 - Carta de controle do JA pelo detector MS/MS

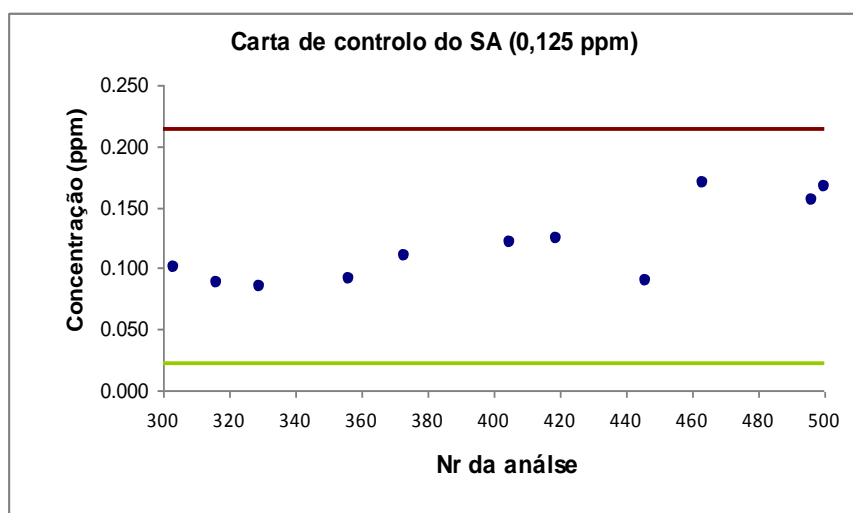


Figura II.4 - Carta de controlo do SA pelo detector DAD

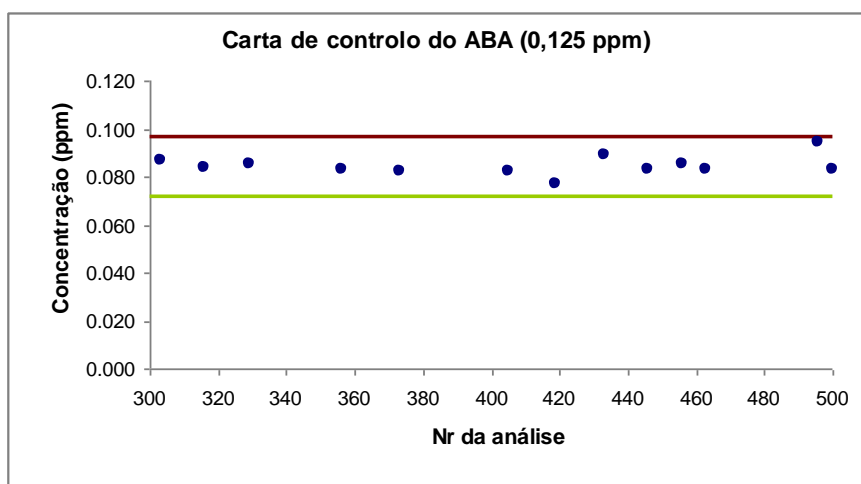


Figura II.5 - Carta de controlo do ABA pelo detector DAD

Anexo III – Resultados do primeiro ensaio

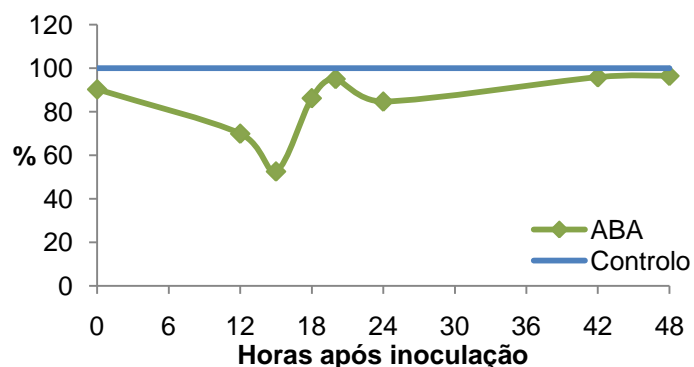


Figura III.1 - Quantificação de ABA (μg de ABA/grama de massa fresca) em amostras de *C. arabica* S4 Agaros (controle) e inoculadas com *H. vastatrix* raça II (interacção incompatível), no primeiro ensaio, em diferentes h.a.i. “Controlo” = média dos valores das amostras “controle” ao longo do tempo.

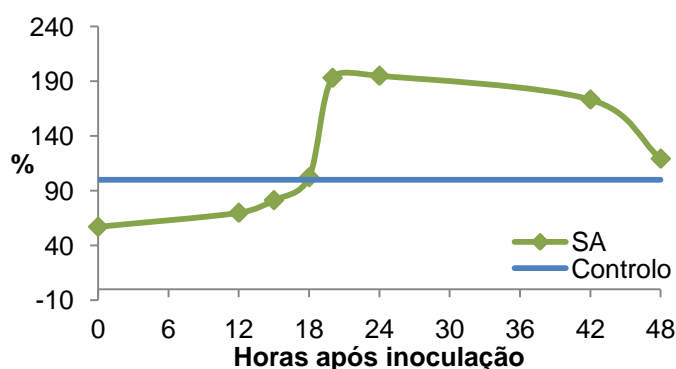


Figura III.2 - Quantificação de SA (μg de SA/grama de massa fresca) em amostras de *C. arabica* S4 Agaros (controle) e inoculadas com *H. vastatrix* raça II (interacção incompatível), no primeiro ensaio, em diferentes h.a.i. “Controlo” = média dos valores das amostras “controle” ao longo do tempo.

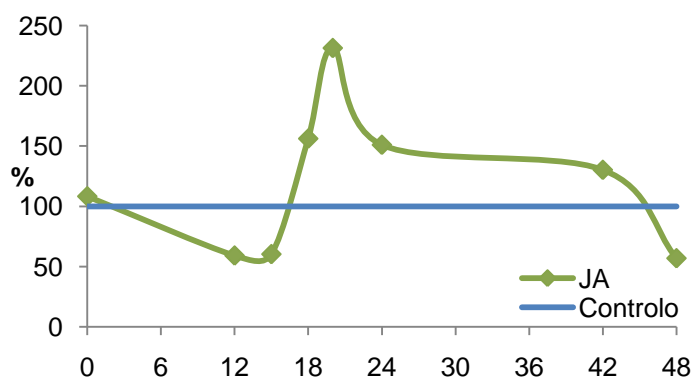
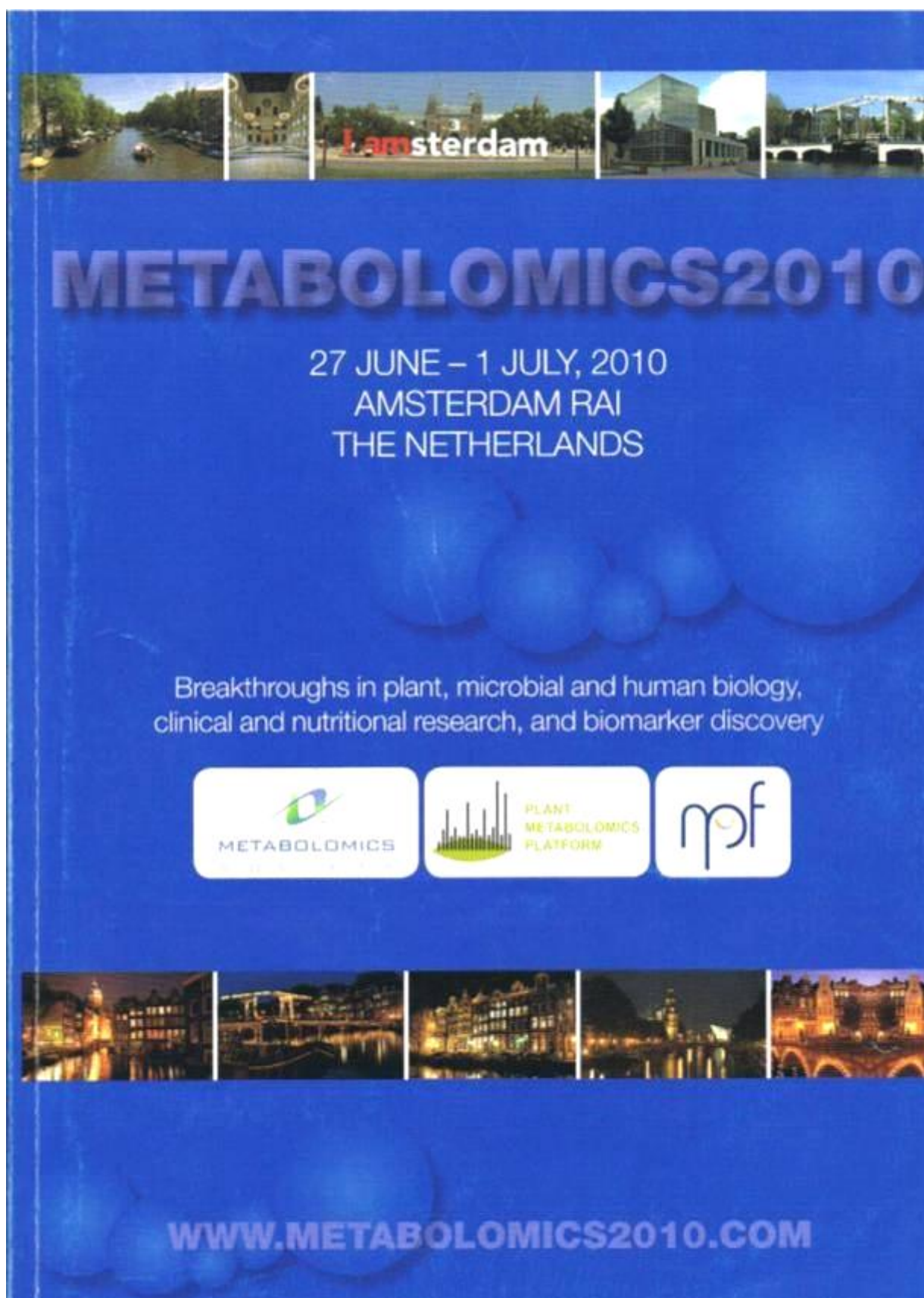





Figura III.3 – Quantificação de JA (μg de JA/grama de massa fresca) em amostras de *C. arabica* S4 Agaros (controle) e inoculadas com *H. vastatrix* raça II (interacção incompatível), no primeiro ensaio, em diferentes h.a.i. “Controlo” = média dos valores das amostras “controle” ao longo do tempo.



METABOLOMICS2010

27 JUNE – 1 JULY, 2010
AMSTERDAM RAI
THE NETHERLANDS

Breakthroughs in plant, microbial and human biology,
clinical and nutritional research, and biomarker discovery

WWW.METABOLOMICS2010.COM

<p>P6B-001 Simultaneous quantification of salicylic, abiotic and jasmonic acids in coffee leaf extracts by HPLC-DAD-MS/MS</p> <p>Sá, M.(1), Bronze, M.B.(2,3), Guerra-Guimarães, L.(4), Vilas Boas, L.(2), Ferreira, J.P.(3), Leitão, S.(1); Almeida, M.H.(1); Silva, M.C.(4); (1)Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia (ISA), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Lisboa, Portugal; (2)Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET), Oeiras, Portugal; (3)IMEO, Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa, Portugal; (4)Centro de Investigação das Ferugens do Cafeeiro (CIFIC), Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT), Oeiras, Portugal.</p> <p>Salicylic acid (SA), abiotic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) are known to be plant hormones that play a crucial role in controlling plant growth, development, and response to biotic and abiotic cues. It has been suggested that crosstalk occur among JA, SA and ABA in plant response to biological threats. The use of a simple and sensitive method to simultaneously quantify multiple classes of phytohormones will facilitate the research of hormone networks and functions. The reduced concentrations of these compounds in real samples corresponding to complex matrices, as it is the case of coffee leaves, requires the optimization of sample preparation techniques and the use of sensitive and selective techniques for their quantification. In this work different sample preparation methods were used to obtain leaf extracts of <i>Coffea arabica</i> and the results of the various methodologies were compared considering SA, ABA and JA content. The best results were achieved when coffee leaves were grounded with liquid nitrogen and extracted with a methanol-water mixture. Analytical conditions were also optimized for the analysis of the extracts by HPLC-DAD-MS/MS. For a better sensitivity and selectivity a MRM mode was used for the quantification, using the best transitions obtained for each compound. Validation parameters as specificity, linearity, accuracy, precision and LOD (Limit of detection) and LOQ (limit of quantification) were determined using both detection modes. The optimized method seems adequate for the quantification of SA, ABA and JA in coffee leaf extracts. Studies are being conducted to understand the role of these phytohormones in the resistance response of coffee to leaf rust (<i>Hemileia vastatrix</i>) Acknowledgments: This work was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/AGR-AAM/71866/2006 and REDE/1518/REM/2005 for the LC-MS/MS equipment).</p>	<p>P6B-002 Effect of fungal elicitors on podophyllotoxin production in <i>Linum album</i> cell culture</p> <p>Sadighen Farnsaezadeh Bahabadi(1), M. Sharifi(1), N. Safaei(2) and M. Behmanesh(3); 1 Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 2 Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 3 Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.</p> <p>Podophyllotoxin (PTOX) is a lignan compound which occurs in a few plant species and has pharmacological significance for its anticancer activities. <i>Linum album</i>, one of endemic species in Iran, has PTOX and other lignans. Lignans are potentially involved in plant defence against pathogens. Fungal elicitors can be used for triggering of secondary metabolite synthesis in plant cell culture. In this study, we investigated the effect of 4 fungal elicitors on cell growth and PTOX production. Cell suspensions on cultures of <i>Linum album</i> were treated with elicitor preparations made from mycelium extracts of <i>Fusarium graminearum</i>, <i>Rhizoctonia solani</i>, <i>Rhizopus stolonifer</i> and <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>. Cell cultures were inoculated at day 7 by fungal elicitors at rate of 5 and 10 % (v/v). Cells were collected for analysing at 48h after elicitation. The highest yield of PTOX, 5µg/gr (FW), and cell growth was achieved from cells were treated by 5% <i>F. graminearum</i> extract. Key words: fungal elicitors, podophyllotoxin, <i>Linum album</i> and cell culture.</p>
<p>P6B-003 Metabolomics in Poplar Research</p> <p>Lena Fragner(1), Anne Mette Hanak(1), Yong-Beom Kang(2), Kristina Ulrich(3), Katrin Fuchs(1, 2), Margarete Watzka(4), Dietrich Ewald(3), Christoph Wawrosch(2), Andreas Richter(4), Wolfgang Wanek(4), Brigitte Kopp(2) and Wolfram Weckwerth(1) (1) Department of Molecular Systems Biology, University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; (2) Department of Pharmacognosy, University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; (3) Johann Heinrich von Thünen-Institute, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries, Institute of Forest Genetics, Eberswalder Chaussee 3A, 15377 Waldsiedersdorf, Germany; (4) Department of Chemical Ecology and Ecosystem Research, University of Vienna, 1090 Vienna, Austria</p> <p>Populus is a widely used bioenergy crop cultivated in short rotation plantations, since it is a fast-growing and robust tree, which can be cultivated on low quality soils, including nutrient-poor, saline and contaminated soils as well as floodplain habitats. The importance of understanding underlying mechanisms of nutrient uptake, growth promotion and stress tolerance is evident in order to improve efficiency of energy production. Thus, poplar as a well studied perennial tree with a completely sequenced genome is an excellent model system to apply metabolomics studies and correlate them to morphological and growth data. Colonization of endophytic bacteria can promote plant growth, stress resistance and enhance control of pathogens. In vitro-grown explants of the Chinese hybrid poplar clone 741 (<i>Populus alba</i> x <i>P. davidiana</i> + <i>P. simonii</i> x <i>P. tomentosa</i>) free from culturable bacteria show significant differences in growth, root development (adventitious roots) and metabolic signature compared to inoculated shoots with <i>Paenibacillus</i> sp. strain P22 (Scherling et al. 2009). On nitrogen free medium inoculated plants are capable to survive and even grow whereas endophyte free plants die. Presented data point to a mutualistic interaction between poplar plants and endophytic bacteria resulting in better adaption to environmental pressure. The observed phenotypic plasticity is investigated by metabolic profiling. References: Scherling C, Ulrich K, Ewald D, Weckwerth W. 2009. A Metabolic Signature of the Beneficial Interaction of the Endophyte <i>Paenibacillus</i> sp. Isolate and In Vitro-Grown Poplar Plants Revealed by Metabolomics. <i>Molecular Plant-Microbe Interactions</i> 22(8): 1032-1037.</p>	<p>P6B-004 Differential expression of metabolites in barley genotypes varying in resistance to <i>Fusarium</i> head blight</p> <p>Kumaraswamy G. K.1, Ajamada C. Kushalappa1, Thin M. Choo2, Yves Dion3 and Sylvie Rioux4 1Plant Science Department, McGill University, Ste. Anne de Bellevue, QC, Canada H9X3V9; 2AAFC, 960 Carling Ave., Ottawa, ON, Canada K1A 0C6; 3CEROM, 740 Chemin Trudeau, Saint-Mathieu-de-Beloeil, QC, Canada J3G 4S5; 4CEROM, 2700 rue Einstein, Ste. Foy, QC, Canada G1P 3W8.</p> <p>Resistance in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) to <i>Fusarium</i> head blight (FHB) caused by <i>Fusarium graminearum</i> is quantitative, involving several resistance mechanisms. Metabolomics approach was used to phenotype resistance in six barley genotypes. The genotypes in the order of resistant to most susceptible were: CI-4196, Zhehar-1, Zhehar-2, Fredrickson, Harbin-2r, and CH 9520-30. The plants were inoculated with macroconidia or mock at anthesis and spikelets were sampled at 96 hours post-inoculation. The lemma and palea were extracted with methanol-water, and analyzed using liquid chromatography and mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap) in negative mode. Univariate analysis identified 150 treatment significant metabolites, and those in higher abundance in resistant than in susceptible genotype were designated as resistance related metabolites. These were assigned with putative names based on the accurate masses and fragmentation pattern. Phenylpropanoid, flavonoid and jasmonate pathways were found active against FHB. The genotype CI 4196 was associated with several significant metabolites in jasmonate and flavonoid pathway, while Fredrickson and Harbin 2r with phenylpropanoid pathway, and Zhehar-2 with flavonoid pathway. Genotype Zhehar-1 was able to degrade DON to DON-O-glucoside, and as compared to others it had less number of resistance related metabolites. Most common resistance related metabolites detected were: coumaric acid, phenylalanine, caffeoyl alcohol and few lignans from phenylpropanoid pathway, and conjugates of kaempferol from flavonoid pathway.</p>

Simultaneous quantification of salicylic, abscisic and jasmonic acids in coffee leaf extracts by HPLC-DAD-MS/MS



Sá, M.¹; Bronze, M.R.^{2,3}; Guerra-Guimarães, L.⁴; Vilas Boas, L.²; Ferreira, J.P.³; Leitão, S.¹; Almeida, M.H.¹; Silva, M.C.⁴.

¹Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal;

²Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal;

³IMED, Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa, Portugal;

⁴Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Instituto de Investigação Científica Tropical, Oeiras, Portugal



INTRODUCTION

Salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) are known to be plant hormones that play a crucial role in controlling plant growth, development, and response to biotic and abiotic cues. It has been suggested (1) that crosstalk occur among JA, SA and ABA in plant response to biological threats. The use of a simple and sensitive method to simultaneously quantify multiple classes of phytohormones will facilitate the research of hormone networks and functions. The reduced concentrations of these compounds in complex samples, as it is the case of coffee leaves, requires the optimization of sample preparation techniques and the use of sensitive and selective techniques for their quantification. In this work different sample preparation methods were used to obtain leaf extracts of *Coffea arabica* and the results of the various methodologies were compared considering SA, ABA and JA content. The optimized methodology for the quantification of SA, ABA and JA was used to understand the role of these phytohormones in the resistance response of coffee to leaf rust.

MATERIALS AND METHODS



MATERIALS: Leaves of *Coffea arabica* S4 Agaro variety (healthy and inoculated with fresh urediospores of *Hemileia vastatrix* race II).

SAMPLE PREPARATION:

Different sample preparation methods (2-5) were used to obtain leaf extracts of *C. arabica* and the results of the various methodologies were compared considering SA, ABA and JA content.

ANALYSIS BY HPLC-DAD-MS/MS:

HPLC system (Waters 2695 Separations Module): quaternary pump, Photodiode Array Detector (Waters 2996. Column Synergi 2.5 mm Max-RP (Phenomenex) at 35°C. Mobile phase: (A)formic acid (0.5%):(B)acetonitrile [0 min (A95%B5%), 30min (A60%B40%), 45min (A10%B90%), 47-60min (A95%B5%)] ; flow rate 0,2 mL min⁻¹.

Mass Spectrometer (Micromass Quattro Micro triple quadrupole): ESI negative mode, capillary voltage 2.5 kV. MRM mode (transitions m/z 137 > 93 for SA, 263 > 153 for ABA, 209 > 59 for JA).

RESULTS AND DISCUSSION

A. SAMPLE PREPARATION

The best results were achieved using the procedure described by Verberne et al (2002). Briefly, coffee leaves were grounded with liquid nitrogen and extracted with 85% MeOH. The mixture was vortexed, sonicated and centrifuged. The supernatant was collected and the pellet was resuspended and extracted twice. The combined supernatants were evaporated and TCA and cyclohexane:EtOAc were added to the residue. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted again. The organic layers were collected and evaporated to dryness. The samples were resuspended in 10% MeOH.

B. ANALYSIS BY HPLC-DAD-MS/MS

Analytical conditions were optimized for the separation and quantification of SA; JA and AA in the extracts. For a better sensitivity and selectivity a MRM mode was used for the quantification, using the best transitions obtained for each compound.



Fig. 1- MS spectrum from standards obtained in SCAN detection mode

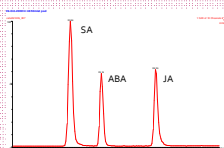
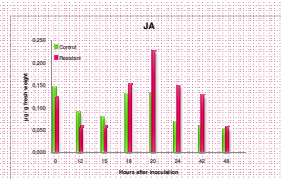
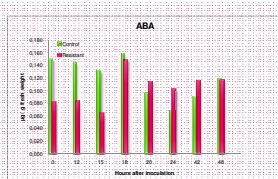
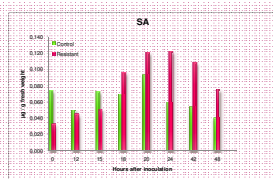


Fig. 2- Chromatogram obtained in MRM detection mode m/z 137>93 for SA, 263>153 for ABA and 209>59 for JA

D. ANALYSIS OF EXTRACTS

Previous cytological studies have shown that *Coffea arabica* S4 Agaro resistance to *H. vastatrix* (race II) is characterized by restricted fungal growth associated with rapid localised plant cell death (hypersensitive reaction – HR), as early as 48 hours after inoculation (6). In order to examine the possible association of these phytohormones with the resistance response, coffee leaves were inoculated with *H. vastatrix* (race II) and extracts were obtained at various times after inoculation. Preliminary results showed at 18-20 hours after inoculation an increase of SA and JA in the resistant plants comparatively to healthy control plants. In contrast, infection by *H. vastatrix* seems to have no significant effect on ABA.



Further work are undertaken to confirm the results obtained.

C. VALIDATION

1. Linearity

	SA	ABA	JA
Range (ppm)	0,0313 - 5,0	0,063 - 1,0	0,0313 - 1,0
r	0,9998	0,9966	0,9983
Linear equation	y=12179x - 110	y=6239x - 468	y=3588x - 129
PG*	0,42	41,03	2,50
F	16,26	98,50	34,12

*Linearity range is accepted when PG < F_{tab} (Mandel Test)

2. Precision

2.1. Repeatability of the equipment

	SA	ABA	JA
0,063 ppm	9	16	2
1,0 ppm	4	5	6
10,0 ppm	2	1	2
Sample	4	7	3

2.2. Repeatability of the method

	SA	ABA	JA
RSD (%)	23	19,1	17,9

2.3. Intermediate precision

	SA	ABA	JA
Conc. Mean (0,125 ppm)	0,1279	0,1249	0,1298
RDS (%)	6%	7%	10%

3. LOD and LOQ

	SA	ABA	JA
LOD (ppm)	0,036	0,031	0,093
LOQ (ppm)	0,093	0,101	0,204

4. Accuracy

	SA	ABA	JA
RSD (%)	20	50	39

The optimized HPLC-MS/MS method seems adequate for the quantification of SA, ABA and JA in coffee leaf extracts. Accuracy results need to be improved.

¹Pan et al. (2008); Phytochemistry 69, pp. 1773 - 1781

²Wilbert, S. et al. (1988); Analytical Biochemistry 257, pp. 186 - 194.

³Verberne, M. C. et al. (2002) Phytochemical Analysis 13, pp. 45 - 50.

⁴López-Carbonell, M. et al. (2009) Plant Physiology and Biochemistry 47, pp. 256 - 261.

⁵Durgbanshi, A. et al. (2005) Journal of Agriculture and Food Chemistry 53, pp. 8437 - 8442

⁶Silva et al. (2008). Physiology and Molecular Plant Pathology 72: 29-38

Acknowledgements

This work was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia: PTDC/AGR-AAM/71866/2006, REDE/1518/REM/2005 for the LC-MS/MS equipment at FFUL, IMED).